ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1982

THESE : 21

LA RELAXINE

THESE

Pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1982
devant l'Université de Paul Sabatier de Toulouse

par

Jean-Luc GONNEAUD

Né le 26 août 1953 à AIX-EN-PROVENCE (Bches-du-Rhône)

Membres du Jury

Président : ..... Monsieur MONROZIES
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs : ..... Monsieur ROYAL
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Monsieur TAINTURIER
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

UNIV.
LEIDEN
1878

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547627_0034

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1982 THESE : 21

LA RELAXINE

THESE

Pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1982
devant l'Université de Paul Sabatier de Toulouse

par

Jean-Luc GONNEAUD

Né le 26 août 1953 à AIX-EN-PROVENCE (Bches-du-Rhône)

Membres du Jury

Président : ..... Monsieur MONROZIES
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs : ..... Monsieur ROYAL
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Monsieur TAINTURIER
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : ..... M.LAUTIE
Directeur honoraire : ..... M. FLORIO
Professeurs honoraires : ..... M. BRIZARD
..... M. SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT
CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
Professeur sans chaire ..... Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire ..... M. RICO
Professeur sans chaire ..... M. BRAUN
Maître Assistant ..... M. BENARD

Physique Biologique et Médicale
Chimie Biologique et Médicale
Informatique biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire ..... M. PAVAUX
Maître Assistant ..... M. LIGNEREUX
Maître Assistant ..... M. SAUTET

Organogénèse - Tératologie
Anatomie Générale - Anatomie Appliquée

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE, PHARMACODYNAMIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire ..... M. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire ..... M. FARGEAS
Maître Assistant Agrégé ..... M. TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie - Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire ..... M. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire ..... M. CABANIE
Maître Assistant Agrégé ..... M. MAGNOL

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique - Clinique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire ..... M. LABIE
Maître de Conférences ..... M. EECKHOUTTE
Maître Assistant Agrégé ..... Mme BENARD

Hygiène - Inspection - Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale - Clinique

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire ..... M. DORCHIES
Maître de Conférences ..... M. FRANC
Maître Assistant ..... M. DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Ecologie - Parasitologie externe
Dermatologie - Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE
DES EQUIDES ET CARNIVORES ET DE LEGISLATION

Professeur titulaire ..... M. LESCURE
Maître de Conférences ..... M. GUELFI
Maître Assistant ..... M. REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL
ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire ..... M. TOURNUT
Maître de Conférences ..... M. BEZILLE
Maître Assistant ..... M. JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie Médicale du bétail et des animaux de basse-cour
Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire ..... M. CAZIEUX
Maître de Conférences ..... M. GENEVOIS
Maître-Assistant ..... M. AUTEFAGE

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale - Radiologie - Technique Chirurgicale - Anesthésiologie
Pathologie Chirurgicale - Clinique - Traumatologie - Podologie orthopédique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire ..... M. FERNEY
Professeur sans chaire ..... M. ROYAL

Pathologie de l'appareil génital et de la mamelle - Sémiologie et Propédeutique - Pathologie de la Reproduction - Obstétrique et pathologie du nouveau-né - Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES -
LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire ..... M. CHANTAL
Maître Assistant ..... M. PICAVET

Epidémiologie - Maladies contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. LAUTIE
Maître Assistant ..... M. PELLERIN

Microbiologie - Immunologie - Pathologie Générale

CHAIRE D'ELEVAGE ET ECONOMIE

Professeur titulaire ..... M. QUEINNEC
Professeur sans chaire ..... M. DARRE
Maître Assistant ..... Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique animale - Extérieur - Zootechnie et Economie générales - Ethologie appliquée, Sciences, Techniques, Economie de l'Elevage et des Productionsanimales
Insémination artificielle - Organisation de l'Elevage

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire ..... M. FALIU
Professeur sans chaire ..... M. GRIESS

Botanique appliquée et Bromatologie - Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. les Professeurs : ANGELIER, ARMENGAUD, COMBES, COMBRET, CROS, FERNET, et MAZENC.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (Délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924).

A TOUTE MA FAMILLE,

A TOUS MES AMIS.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

Monsieur le Professeur MONROZIES

qui nous a fait l'honneur d'accepter
la présidence de notre Jury de Thèse.

Hommages respectueux.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur ROYAL
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

qui nous a permis de mener à bien ce travail, qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

Monsieur le Professeur TAINTURIER
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

dont l'enseignement nous a été très profitable, nous lui exprimons ici, nos remerciements et notre respect.

2. Sur le col de l'utérus

a. chez la Vache

b. chez la Truie

c. chez les Primates

d. chez la Brebis

e. chez les Rongeurs

3. Sur l'utérus

a. l'utérus en général

b. le myomètre

c. l'endomètre

d. la trame collagène et l'extensibilité de l'utéru

4. Sur le vagin

5. Sur la mammelle

C. Sources et concentrations plasmatiques de relaxine

1. Chez la Truie

2. Chez la Ratte

3. Chez la Femme

4. Chez la Lapine

5. Chez le Hamster

6. Chez la Brebis

7. Chez la Vache

8. Chez le Mâle

D. Récepteurs de la relaxine

E. Mécanismes de contrôle de la secretion

F. Rôle physiologique de la relaxine

CONCLUSION

INTRODUCTION

Parmi les nombreuses hormones qui tiennent un rôle dans l'endocrinologie de la reproduction chez les mammifères, certaines ont immédiatement suscité l'intérêt : c'est le cas pour les stéroïdes ou les prostaglandines. Il en est une dont la découverte, antérieure à celle des progestagènes, n'a pas provoqué chez les chercheurs l'enthousiasme des précédentes. La relaxine, découverte par HISAW vers la fin des années 1920, n'a pas beaucoup attiré l'attention jusqu'à une période très récente.

En 1951, FRIEDEN et HISAW (51) publient un article dans lequel ils montrent que des extraits bruts de cette substance provoquent des modifications dans la composition biochimique et les propriétés mécaniques du tissu de la symphyse pubienne du cobaye, ainsi qu'un certain pouvoir d'inhibition vis à vis des contractions utérines. Mais les premières préparations employées étaient peu purifiées et les méthodes entâchées de subjectivité.

Ainsi, durant les 25 dernières années, s'est-on attaché à isoler une relaxine pure, à en déterminer la composition et la structure pour pouvoir en découvrir les possibilités pharmacologiques et physiologiques.

Des progrès considérables ont eu lieu en ce qui concerne l'étude des effets biochimiques sur le tissu conjonctif, et dans la compréhension du processus de sécrétion de l'hormone par le corps jaune.

I - HISTORIQUE

Au cours de leurs travaux sur l'activité hormonale du corps jaune, HISAW et ses étudiants identifièrent deux substances, l'une nommée "corporine" (qui s'avéra par la suite être un mélange d'oestrogènes et de progestérone) et la "relaxine" dont nous savons maintenant qu'il s'agit d'un polypeptide actif sur le tissu conjonctif et les muscles lisses de l'appareil reproducteur. C'est peut-être de façon fortuite qu'HISAW prépara son extrait à partir du corps jaune de truie gestante, source qui contient de la relaxine à une concentration de loin supérieure à ce que l'on peut trouver chez d'autres espèces.

Par ailleurs, HISAW manifestait un grand intérêt pour les transformations subies par la symphyse pubienne en fonction du déroulement de la maturation sexuelle et de l'état (ou non) de gestation chez de nombreux mammifères.

La découverte principale d'HISAW en 1926 (68) fut de constater qu'un extrait aqueux (la relaxine) de corps jaune de truie gestante " relaxait " la symphyse pubienne chez un cobaye ayant subi des injections d'oestrogènes en quantités adéquates, alors qu'un extrait lipidique du même tissu induisait un état progestationnel de l'utérus (40).

Des expériences ultérieures ont révélé que l'action des deux principes extraits ne s'exclue pas l'un-l'autre : un mélange d'oestrogènes et de progestérone, en induisant la sécrétion de relaxine endogène par le tractus génital peut provoquer rapidement la relaxation de la symphyse pubienne du cobaye (63).

Inversement, la relaxine seule peut provoquer des changements de type "progestérone" sur l'endomètre (157) (70), aussi bien que dans le maintien de la gestation après ovariectomie dans certaines espèces (158),(1o7), (59).

Dans les années suivant la découverte d'HISAW, on a identifié d'autres effets de la relaxine sur l'appareil reproducteur. Action sur le myomètre, sur l'endomètre, le col utérin et la glande mammaire. Les effets sur la peau, les vaisseaux sanguins, et les autres tissus conjonctifs sont moins certains, soit que les extraits employés aient été mal purifiés, soit que les observations aient été contrôlées de façon insuffisante.

Le problème le plus ardu dans les recherches sur la relaxine fut le manque de progrès en ce qui concerne les travaux sur l'isolement et la purification de la molécule. Il fallut attendre les années 1960 pour que FRIEDEN (49), COHEN (23) et GRISS (56) fassent des progrès suffisants sur la purification du produit, et ce n'est que dans le courant des années 1970 que SHERWOOD et O'BYRNE (132) identifièrent précisement la composition en acides aminés de la relaxine de porc, d'où la détermination de sa structure primaire : SCHWABE (127), (128), (129).

Un autre frein dans ces recherches tenait à la difficulté de doser l'hormone. Au départ, la méthode originelle basée sur la recherche de l'effet biologique conduisit à la définition de l'Unité Cobaye (Guinea - pig - unit = GPU). Elle était fondée sur l'estimation subjective du degré de mobilisation de la symphyse pubienne d'un cobaye préparé par les oestrogènes, six heures après injection de relaxine (145). En l'absence d'une unité standard reconnue de façon universelle, il était inévitable que les différents laboratoires montrent des variations marquées quant à la valeur objective de la G.P.U. Ainsi, lorsqu'un laboratoire dosait les préparations de relaxine de cinq autres laboratoires, il pouvait, par référence à son propre standard, trouver les rapports suivants :

1,07 ; 0,382 ; 0,196 ; 0,030 ; et 0;012.(140).

La G.P.U. n'avait donc pas de réelle signification quantitative.

Ce problème fut partiellement résolu par l'adoption d'un dosage sur la souris avec mesure beaucoup plus objective du ligament pubien (145).

Les méthodes de dosage fondées sur l'inhibition de la motilité utérine in vitro ne furent pas poursuivies à cause du manque de spécificité de la méthode.

Aucun des dosages biologiques n'étant assez sensible pour évaluer le taux plasmatique dans le sang veineux chez d'autres espèces que le lapin et le cobaye, on en vient à établir un dosage radioimmunologique (Radio immuno assay = RIA) parfaitement fiable s'avérant indispensable puisqu'il s'agissait alors de connaître les sites de production de la relaxine, de mesurer sa concentration plasmatique pendant la gestation dans plusieurs espèces, et de savoir quels facteurs interviennent pour moduler la sécrétion de l'hormone.

II - BIOCHIMIE DE LA RELAXINE

A. ISOLEMENT ET PURIFICATION

C'est en 1930 qu'HISAW & coll tentèrent pour la première fois à l'extraction de la relaxine avec comme matière première, des corps jaunes d'ovaires de truie, traités par l'acide chlorhydrique en milieu alcoolique, en procédant après neutralisation et séchage, à des distillations successives par l'ether et l'alcool : FEVOLD (40).

Ainsi, fut-il isolé un produit (la relaxine) stable en milieu acide, ayant un point iso-électrique de 5,4 à 5,5 ; sensible à la digestion par la trypsine et la pepsine, précipitable par l'acide picrique. Les préparations ayant un caractère amphotère avec 11 % d'azote, on suggéra que la relaxine était un polypeptide, hypothèse largement confirmée par la suite.

D'autres méthodes plus pratiques, et aussi plus fines, furent mises au point pour extraire la relaxine, faisant appel aux techniques les plus récentes de la biochimie analytique.

Ainsi, SCHWABE & coll (130) partant d'une préparation d'ovaires de truie maintenue en semi-congélation après broyage à basse température, procèdent à une séparation par acide-acétone puis à une absorption sur "CM - cellolose". Le produit est alors soumis à une chromatographie sur colonne (Sephadex G-50 ou Sephadex G-15).

Par ces méthodes, il apparut que la relaxine pourrait être composée d'un ensemble de sous-fractions(2 ou 3 selon les auteurs et l'espèce) individualisables par chromatographie. L'activité biologique des fractions obtenues ayant été vérifiée par deux tests :

- l'un basé sur la séparation de la symphyse pubienne de cobaye ou de souris in vivo

- l'autre basé sur l'inhibition, in vitro, de l'activité du myomètre.

Plusieurs recherches ont suivi, portant sur les différences possibles de ces sous-fractions entre elles selon qu'elles étaient soumises à l'un ou à l'autre test.

Ainsi, FRIEDEN (49) tendait à montrer qu'à côté d'une substance ayant un effet sur la symphyse pubienne et sur le myomètre, l'ovaire de truie contenait une autre substance n'ayant que l'effet inhibiteur sur le myomètre. Alors que GRISS & coll (56) ne trouvent, après purification poussée, qu'une seule substance ayant les deux effets utéro - et symphyséotrope, SHERWOOD & O'BYRNE (132) procédant par chromatographie sur résine échangeuse d'Ions d'extraits d'ovaires de truie, séparent 3 fractions (nommées CMB, CMa et CMa') ayant chacune un pHi différent, mais le même effet sur le ligament interpubien de la souris.

En 1979, SHERWOOD (131) rapporte dans une étude sur la ratte la présence de 2 formes hautement purifiées, nommées CM 1 et CM 2 ayant une activité biologique et un poids moléculaire comparables mais une séquence d'acides aminés légèrement différente. Les auteurs ont alors pensé qu'il pouvait exister une microhétérogénéité expliquant de possibles différences de spécificité au sein de la relaxine.

Néanmoins, de récentes expériences de WALSH & NIALL (152) tendent à infirmer toutes les assertions sur l'existence des différentes fractions (CMB, CMa, CMa' ou CM1 et CM2) aussi bien chez le rat que chez le porc, les formes hétérogènes de relaxine n'existant pas in vivo et seraient dues à la méthode d'isolement par protéolyse employée par SHERWOOD & O'BYRNE(132).

B. SEPARATION DES CHAINES ET COMPOSITION CHIMIQUE

C'est grâce à la méthode d'extraction de SHERWOOD (132) que l'on a pu obtenir des quantités suffisantes de relaxine porcine pour une analyse détaillée. La chromatographie donne 3 fractions (CMB, CMa, et CMa') ayant chacune un pouvoir de 2 500 à 3 000 GPU/mg et de petites différences dans leur composition aminoacides. La fraction CMa est soumise à une filtration en milieu gélosé et une chromatographie sur "Sephadex G-50" après réduction et alkylation. Deux composants majeurs sont alors identifiés. On en conclut que la fraction CMa est constituée de 2 sous unités de taille similaire, d'un poids moléculaire respectif de 2 528 Dalton (A) et 2 919 Dalton (B).

Les deux composants séparés grâce à leur différence de solubilité en milieu acide acétique (pH4) sont nommés A et B. Tout comme pour l'insuline, la chaîne A reste soluble alors que la chaîne B est séparée par centrifugation.

C'est en 1976 que SCHWABE & Coll (128) réussissent à déterminer la séquence des acides aminés (a.a.) composant la chaîne A grâce à la méthode désormais classique de digestion partielle et répétée de la molécule. En 1977 (129) la même équipe publia la séquence de la chaîne B.

La chaîne A possède 22 maillons a.a et la chaîne B, 26 d'où un poids moléculaire total de 5 600 à 5 800 Dalton.

Pour ce qui est du problème de la microhétérogénéité des extraits, alors que SHERWOOD (132) recense les 3 composants où CMB serait une relaxine avec une chaîne B à 28 acides aminés, CMa avec une chaîne B à 31 a.a et CMa' avec une chaîne B à 29 a.a, la méthode de WALSH (152), en niant l'existence in vivo de ces composants, ne produit qu'une seule molécule de relaxine avec une chaîne B à 31 a.a dont la séquence au niveau C Terminal serait Gly 28 - Arg 29 - Thr 30 - Ala 31. CMa serait le seul produit stocké dans l'ovaire de truie, CMB et CMa' n'en étant que des formes dégradées au cours de l'analyse.

Les ponts Disulfure

Après digestion par la trypsine de la molécule de

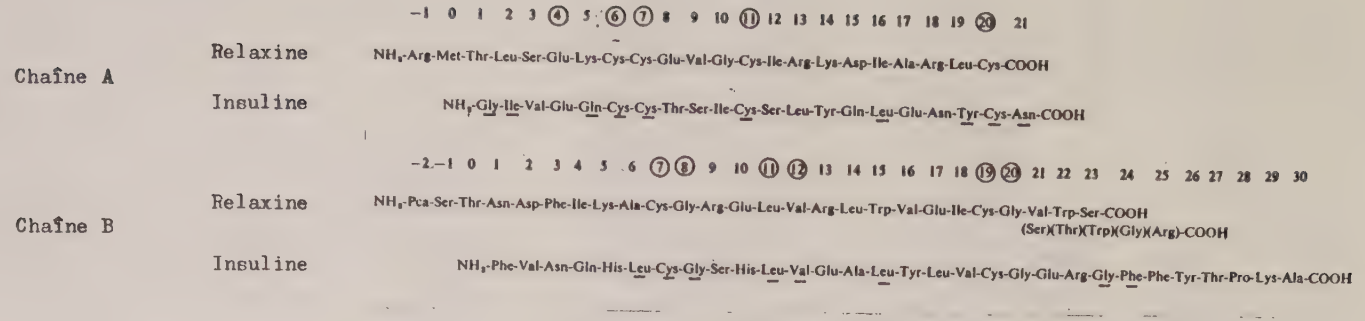


Figure 1 - Comparaison des Structures primaires respectives de la relaxine et de l'insuline de porc
Les Cystéines sont placées en vis à vis pour chaque chaîne (les différences de Séquence pour la chaîne B relaxine sont indiquées entre parenthèses).
Les Acides Aminés identiques dans la relaxine et l'insuline sont entourés d'un cercle ; les a.a invariants dans toutes les Insulines connues sont soulignés.

D'après BEDAKAR & Coll (6)

* pca = Acide pyroglutamique.

relaxine et chromatographie sur colonne, il fut possible d'identifier deux fractions contenant des ponts disulfures (130) (fig. 1). La localisation de ces ponts au sein de la molécule fut assez facile puisque seuls les a.a cystéine peuvent présenter cette particularité et que, précédemment, la position des "cystéines" le long des deux chaînes avait été précisement établie. D'autant que dès le début des recherches, de nombreux résultats étaient apparus très proches de ceux obtenus lors de l'étude de l'insuline.

C. HOMOLOGIE AVEC L'INSULINE, STRUCTURE BI & TRIDIMENSIONNELLE

Comme l'indique la figure 1, la similitude entre les molécules de relaxine et d'insuline est manifeste : si l'on prend comme points de repère la position des molécules de cystéines impliquées dans les ponts disulfures, on peut remarquer qu'il y a possibilité de calquer les positions des cystéines qui sont séparées par le même nombre d'acides aminés dans les chaînes homologues des deux molécules.

Quoiqu'il n'y ait que cinq positions dans la chaîne A et 6 dans la chaîne B pour lesquelles les acides aminés soient identiques dans les deux molécules, les modèles présentés suggèrent que la structure tertiaire des deux molécules est, sinon identique, du moins très proche. Les travaux de BEDRKER & Coll (6) et de JAMES & Coll (79) le prouvent. En partant du principe que les acides aminés hydrophobes sont situés au centre de la molécule, les a.a hydrophiles à la périphérie, l'étude de la séquence amino-acides montre que les plicatures des chaînes se font à des niveaux comparables sur les deux molécules et donnent une configuration spatiale très semblable.

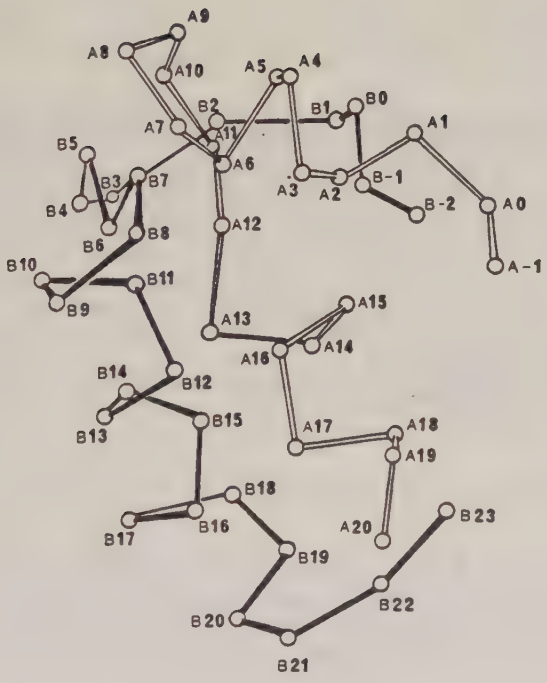


Figure 2 : configuration Spatiale de Relaxine. Les 0 indiquent la position des Carbones α dans les acides aminés.

D'après BEDARKER & coll -(6) 1977

La question s'est posée de savoir si la relaxine pouvait avoir une activité de type "Insulinique", mais l'absence d'un acide aminé supplémentaire au carbone terminal de la chaîne A et la substitution au niveau B 23 par un acide aminé lévogyre apporte selon ISAACS & Coll (77) la preuve qu'il n'en est rien. Notons aussi que l'Histidine B10 de l'insuline, responsable de la liaison de cette molécule avec le zinc, n'existe pas dans la relaxine, d'où il semble peu probable qu'on puisse précipiter la relaxine en présence de zinc.

Il est étonnant de constater à quel point relaxine et insuline sont semblables, aussi bien dans leur configuration primaire que secondaire ou tertiaire. Il est probable que l'insuline et la relaxine soient apparentées l'une à l'autre à travers un ancêtre commun ressemblant à la pro-insuline. Cette homologie a fait entrer la relaxine dans la famille des facteurs de croissance de type insuline qui sont des peptides ayant des similitudes structurales et fonctionnelles, en modulant croissance et activité cellulaires. Ce sont :
- le facteur de croissance des nerfs (NGF)
- les somatomédines A et C
- le facteur stimulant de la multiplication
- les polypeptides à activité insulinique non suppressibles (NSILA)

D. RELATION ENTRE STRUCTURE ET ACTIVITE

Il n'y a pas eu de travaux systématiques pour étudier le rapport entre structure et activité de la relaxine. SCHWABE & BRADDON (127) se sont intéressés à l'importance du Tryptophane dans l'activité biologique de la molécule qui en contient 2. L'oxydation partielle montre que l'un des deux Try. n'est pas essentiel pour l'activité biologique, l'autre si.

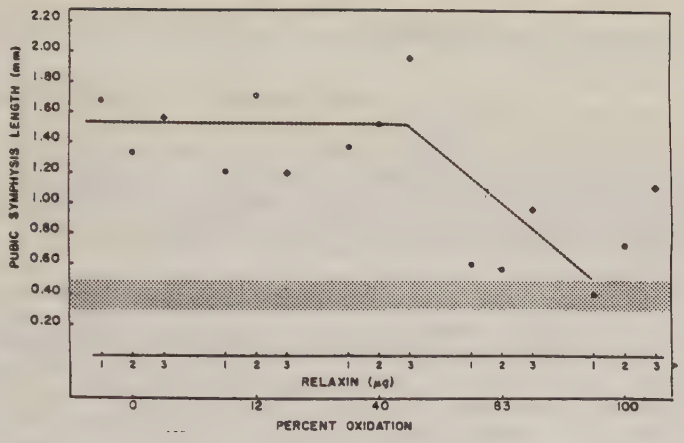


Figure 3 - Activité de la relaxine dans le dosage sur la souris après oxydation du Tryptophane par le N-bromosuccimide. A 0, 12, 40, 83 et 100 % d'oxydation, 3 groupes de souris reçoivent 1, 2 ou 3µg de la Relaxine oxydée.

D'après SCHWABE & BRADDON (1976) (127).

Ceci s'explique en admettant que le Try B 22 est oxydé sans effet majeur car placé en bout de chaîne, alors que l'oxydation du Try B15, situé en milieu de chaîne dans le noyau hydrophobe de la molécule, conduit à la rupture de celle-ci et à son inactivation.

Par ailleurs, un allongement de la chaîne A (par alkylation de la Méthionine Ao) ne modifie pas l'activité biologique alors qu'une rupture de celle-ci au même niveau Ao inactive la molécule.

E. PRO RELAXINE

Il n'y a pas de preuve formelle de l'existence d'une pro-relaxine comme il existe une pro-insuline, où la chaîne B constitue le peptide N.Terminal d'une seule chaîne synthétisée d'un seul tenant de façon à faciliter un pliage adéquat de la molécule, clivée ensuite par une enzyme spécifique ; mais FRIEDEN & YEH (52) ont montré qu'une protéine d'un poids moléculaire de 42 000 D environ extraite de l'ovaire de truie, une fois soumise à une digestion partielle par la trypsine, produisait des éléments ayant la mobilité électrophorétique, les possibilités biologiques de la relaxine et un poids moléculaire de l'ordre de 5 800 Dalton.

F. EVOLUTION D'une HORMONE

On ne peut conclure cette étude biochimique sans évoquer ce que peut être l'évolution d'une hormone à travers les différents embranchements du règne animal. L'homologie entre relaxine et insuline, la particularité structurale liée à la présence des ponts disulfures identiques, laisse penser que les deux hormones sont issues d'un ancêtre commun et se sont différenciées par duplication génétique (77).

Si l'on compare les deux molécules par leur composition en acides aminés, on constate qu'il a fallu 50 mutations ponctuelles pour passer de l'une à l'autre. En admettant un taux moyen de 2 unités Pauling (1 UP = 1×10^{-3} mutation par acide aminé et par an), la duplication du gêne commun remonterait à 5×10^{8} ans. Ceci nous ramène à la période cambrienne, 50 millions d'années avant la séparation des requins d'avec la branche principale des vertébrés qui aurait éventuellement donné naissance aux mammifères. Même en considérant ces supputations comme très approximatives, on en vient à constater qu'entre la duplication qui marque le premier pas d'une différenciation génétique, et l'apparition du premier animal qui dépendra de la nouvelle hormone, il s'est écoulé une période d'environ 400 millions d'années. Une telle prévoyance laisse rêveur.

En considérant que l'insuline a un taux très faible de mutations (0,4 pauling) ce qui se conçoit en raison de l'importance de son rôle métabolique, on voit qu'elle n'aurait pu modifier que 20 acides aminés pendant le même laps de temps. Or SCHWABE & Coll (130) en analysant des extraits d'ovaires de requin des sables, y a montré la présence d'un peptide ayant l'activité de la relaxine la structure avec les ponts disulfures, et l'analyse des acides aminés de cette protéine montre qu'elle ressemble davantage à l'insuline du porc qu'à la relaxine du même animal. Ceci tendrait donc à prouver qu'il existe bel et bien une parenté génétique entre les deux molécules.

III - METHODES DE DOSAGE DE LA RELAXINE

A.. LES DOSAGES BIOLOGIQUES

A la base, les dosages biologiques sont fondés sur deux propriétés essentielles de la relaxine : son effet ligamentoplastique sur le ligament interpubien de la souris ou du cobaye in vivo, et son effet myorelaxant sur les fibres musculaires lisses de l'utérus in vitro.

1. Séparation de la symphyse pubienne

a. chez le Cobaye

Le test étudié par ABRAMOWITZ & COLL (1), FRIEDEN & HISAW (51), KROCK & COIL (84) est basé sur une estimation subjective du degré de mobilité de la symphyse pubienne par palpation après action de la relaxine. Donc, en plus de l'imprecision inhérente au caractère biologique de la méthode, s'ajoute une source d'erreur supplémentaire due à l'imprecision de l'évaluation du résultat : mobilité ou pas. (TALMAGE & HURST : 149).

D'après STEINETZ & Coll, (145), on peut augmenter la fiabilité de l'épreuve sous certaines conditions : randomisation, évaluation des effets par deux observateurs différents, utilisation de trois groupes de 20 cobayes, enregistrement des résultats par un troisième opérateur indépendant. Dans ces conditions la fiabilité approche 95 %, mais dans des limites très larges. La méthode est laborieuse, longue et onéreuse. De plus, quoique les animaux puissent être utilisés pour plusieurs dosages successifs, ils présentent après chaque essai une résistence marquée à la relaxine porcine pendant 6 à 8 semaines; (FRIEDEN & ADAMS - 50) et au cours du temps les cobayes peuvent présenter des variations individuelles de sensibilité (FRIEDEN - 48).

Quoiqu'il en soit, pour réaliser une économie de temps et de matériel, le test a été largement utilisé suivant la manière préconisée par ABRAMOWITZ(1) pour approcher la réalité le plus près possible. Dans ces conditions, une unité cobaye ou GPU (guinea-pig-unit) est définie comme étant la quantité de relaxine qui, dans un délai de 6 heures, provoque de façon indubitable l'ouverture de la symphyse pubienne de 9 cobayes parmi les 12 soumis au test ; les cobayes pesant de 350 à 800 g, présumés "vierges", et ayant subi un pré-traitement aux oestrogènes à la dose de 0,83 µg par cobaye de 17 B oestradiol pendant 4 jours avant administration de la relaxine.

b. chez la Souris

Etabli par HALL (57) puis STEINETZ & Coll (145) il est basé sur l'élongation d'un ligament reliant les os qui, chez la souris, forment le pubis, phénomène qui se produit normalement en fin de gestation mais qui peut être provoqué chez une souris non gestante, ou même ovariectomisée, par injection de relaxine.. Comme chez le cobaye, une induction préalable par les oestrogènes avant le test semble être requise pour optimiser l'action de la relaxine.

Pour STEINETZ (145) la meilleure méthode consiste à opérer sur 6 groupes de 20 souris recevant des doses croissantes de relaxine. Les souris dites "vierges" doivent peser de 22 à 26 g. Sept jours avant l'expérience, chacune reçoit une injection de 5 µg de cyclopentyl propionate d'oestradiol. De façon à obtenir une courbe dose-réponse satisfaisante, on a estimé qu'un minimum de 250 µg de relaxine dans le standard et les échantillons à doser est nécessaire. En outre, pour obtenir une action optimale de la relaxine, il est nécessaire de l'administrer dans une solution aqueuse à 1% de Benzopurpurine 4.B., un colorant azoïque qui assure la libération lente du produit. Dix huit à vingt quatre heures après administration de relaxine, les souris sont tuées et la symphyse pubienne disséquée, le tissu conjonctif adjacent soigneusement éliminé et on procède à la mesure du ligament interpubien, après transillumination du canal pelvien, au microscope équipé d'un oculaire micrométrique. Certains auteurs (HALL-NEWTON : 62) préconisent la mesure sur radiographie..

Les résultats sont exprimés en fraction d'activité par rapport au standard de référence. KLIMAN & Coll (82) ont alors introduit la notion d'unité souris : MU = Mouse Unit ; comme étant la quantité de relaxine qui augmente, chez la souris, la longueur du ligament pubien de 0,65 mm. Par souci d'homogénéité, on a préféré la GPU, et KLIMAN (82) ayant effectué des dosages comparatifs chez le cobaye et la souris parallèlement, a constaté une proportionnalité dans la réponse chez les deux espèces d'où l'équivalence : 10 GPU = 1 MU. Le dosage chez la souris, d'une précision très satisfaisante, facilement reproductible, présente l'avantage d'être plus rapide et moins onéreux que le dosage chez le cobaye.

2.. Inhibition de l'activité du myomètre

Cette méthode n'a pas connu le succès des précédentes en raison de la variabilité de comportement de l'utérus en fonction des individus et l'apparition de phénomènes de tachyphylaxie après plusieurs contacts avec la relaxine.. La méthode basée sur les observations primordiales de KRANTZ, BRYANT & CARR (83) s'inspire du fait que la relaxine inhibe de façon réversible l'activité du myomètre in vitro, et aussi in vivo.On en tire un

test qualitativement fiable, mais peu d'auteurs ont publié les résultats d'essais statistiques valables pour pouvoir en faire un moyen de dosage quantitatif réellement utilisable.

WIQUIST & PAUL (154) ont fait part de leur méthode établie en ce sens mais ils regrettent le caractère imprévisible de la sensibilité du myomètre à la relaxine. Dans une expérience similaire à partir de l'utérus de souris en oestrus, chaque utérus séparé en 2 ou 4 parties immergées dans une solution adéquate, permet un étalonnage plus objectif par comparaison entre le morceau traité et le morceau témoin, et en référence avec un standard d'activité connue (84). Mais quand les auteurs comparent cette méthode aux précédentes, ils la relèguent au rang d'un test efficace dans le cas d'un "screening" rapide.

Peu précis, laborieux, d'une sensibilité variable et plutôt faible, les dosages biologiques présentent de sérieux inconvénients. En fait, le développement des dosages radioimmunologiques représente un progrès considérable en la matière, encore qu'il faille bien s'assurer que le produit que l'on a ainsi dosé soit bien la substance active.

B. DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES

La mise au point d'un dosage radioimmunologique (radioimmuno assay = RIA) pouvant mesurer de faibles quantités de relaxine dans le sérum de nombreuses espèces a été sujette à de nombreux déboires. Jusqu'en 1973, on ne connaissait pas la composition exacte en acides aminés de la relaxine porcine. La préparation de relaxine distribuée alors par le National Institute of Arthritis and Metabolical Diseases aux Etats-Unis sous le nom de "NIH. R-P1" dosait 442 GPU/ml contre environ 3 000 GPU/ml pour une relaxine "pure" isolée par la suite.

NIH. R-P1 ne contenait donc que 15 % de relaxine pure contre 85 % de peptides ovariens divers. En 1972, BRYANT (12) fut la première à publier une méthode de RIA pour la relaxine en utilisant NIH. R-P1 comme antigène pour la préparation d'un antisérum sur le lapin. Le "radio-ligand" fut préparé par séparation en chromatographie sur colonne Sephadex, du pic de protéine radioactive après iodation par I^{131} de NIH.R-P1 suivant la méthode de HUNTER & GREENWOOD (1962) (76). Par la suite, BRYANT et ses collaborateurs se livrèrent à de nombreux dosages plasmatiques de la relaxine dans de nombreuses espèces et à des états physiologiques variés. (14) (15) (16) (22). Ces résultats sont donc fortement sujets à caution puisque la mise à jour de la séquence amino-acides de la relaxine par SHERWOOD & Coll (132) montrait l'absence de Tyrosine ou d'Histidine, les seuls acides aminés susceptibles d'être marqués par l'iode. BRYANT a donc marqué des protéines ovariennes indépendantes de la relaxine dans NIR.R-P1, encore que selon BRYANT-GREENWOOD & GREENWOOD, 1979 (17); cette méthode ait pu mettre en évidence des molécules de relaxine altérées, ou une pro-relaxine.

La difficulté fut contournée par SHERWOOD & Coll en 1975 (133) la relaxine ne contenant pas de Tyrosine à l'état naturel, ils réussirent à lier cet acide aminé à la molécule par liaison covalente, obtenant alors une polytyrosyl-relaxine où le rapport Tyrosine/Relaxine est de 1,67 susceptible d'être aisément marquée par l'Iode 125, le tout sans que l'activité biologique dans le dosage sur le ligament pubien de la souris en soit affectée.. Cette méthode, sensible jusqu'à 32 pg de relaxine semble très spécifique de la relaxine de truie car l'antisérum préparé sur lapin a des réactions croisées très faibles ou même nulles avec les sérums d'autres espèces..

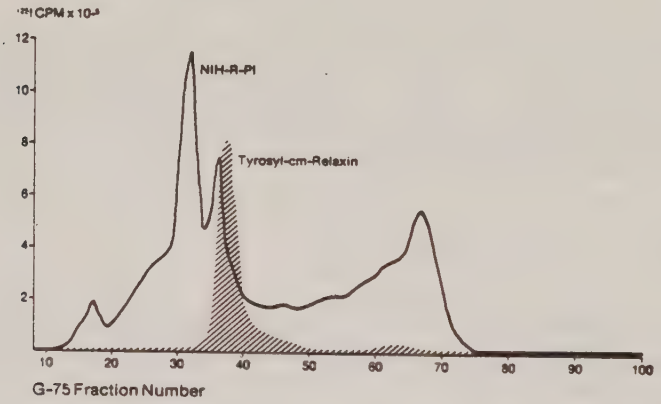


Figure 4 - Comparaison des Chromatogrammes de NIH. R-P1 et de la polytyrosyl-relaxine sur Sephadex G-75.
Pour NIH. R-P1, on note 4 pics de radioactivité dont aucun ne correspond à la relaxine CM purifiée.

D'après SCHWABE & Coll - 1978 (130).

Néanmoins O'BYRNE & STEINETZ (98) pensent avoir adapté cette méthode avec succès pour mesurer la relaxine chez les femelles en gestation de rat, souris, cobaye, hamster, babouinet chez la femme. D'après eux, toute la finesse de la méthode consiste à obtenir des lapins suffisemment coopératifs pour produire des antisérums polyvalents.

TABLEAU I.

Distribution de la relaxine dans le règne animal

ESPECE	ETAT PHYSIOLOGIQUE	TISSU	QUANTITE DE RELAXINE (GPU/g ou ml)
Requin	Gestation	Ovaire	4-10
Poule	Maturité sexuelle	Ovaire	10
Coq	Maturité sexuelle	Testicule	2-5
Opossum	Cycle oestral	Corps jaune	2-3
Chien	Gestation	Sérum	présence
Chat	Gestation	Sérum	1,5
		Placenta	0,5
Rat	Gestation	Ovaire	720
		Sérum	0,001
Souris	Gestation	Ovaire	200
		Sérum	0,1
Hamster	Gestation	Sérum	0,1
Cobaye	Gestation	Sérum	0,5
Lapin	Gestation	Ovaire	25-30
		Placenta	50-75
		Sérum	10
Porc	Gestation	Corps jaune	600-10.000
		Sérum	2
Vache	Gestation	Corps jaune	10-100
		Sérum	0,2-1.
Jument	Gestation	Sérum	présence
Baleine	Gestation	Corps jaune	500-600
Singe Rhésus	Gestation	Sérum	0,001-0,002
Babouin	Gestation	Sérum	0,001-0,002
Femme	Gestation	Ovaire	1,5-3
		Sérum	0,001-0,003
	Phase lutéale du cycle	Ovaire	0,01-0,03

D'après HISAW & ZARROW (72); O'BYRNE & STEINETZ (98); STEINETZ & coll.(141) O'BYRNE & coll.(101) et CASTRO-HERNANDEZ (20).

IV - BIOLOGIE DE LA RELAXINE

A. DISTRIBUTION DANS LE REGNE ANIMAL

On trouve surtout la relaxine dans le serum sanguin et certains tissus des mammifères, le plus en rapport avec l'état de gestation. (voir Tableau I). Aussi les effets décrits plus loin vont-ils de pair avec la gestation, l'accouchement et la lactation.

La source, de loin la plus riche en relaxine, se trouve être l'ovaire de la truie gestante. Rien d'étonnant que celle-ci ait été exploitée pour tous les travaux d'isolement et de purification.

On constate néanmoins que ni le statut de mammifère, ni l'état de gestation ne semblent indispensables à la production de la relaxine. On en trouve dans les ovaires de requin, les testicules du coq mais rien en ce qui concerne son rôle chez le mâle n'a pu être mis à jour.

B. EFFETS BIOLOGIQUES DE LA RELAXINE

1. La symphyse pubienne

Le bassin osseux constitue un obstacle au passage des foetus arrivés à terme à leur taille maximale.. Ceci est parfois cruellement mis en valeur par ce que l'on appelle l'excès relatif du volume foetal, à l'origine de certaines causes de dystocie en obstétrique humaine aussi bien que vétérinaire. Dans de nombreuses espèces, dont l'homme, on constate la présence de mécanismes susceptibles d'atténuer l'inflexibilité du bassin. Ainsi, la taupe américaine commune (Scalopus Aquaticus Machrinus) chez laquelle la symphyse pubienne ne se ferme pas et où le pubis présente une soudure secondaire, dorsalement au rectum.

Chez le rat à bourse (Geomys bursarius), à maturité sexuelle les os pubiens de la femelle sont résorbés laissant le pelvis ventralement ouvert en permanence.

La séparation des os iliaques à un degré plus ou moins important, qui s'effectue à terme dans un certain nombre d'espèces (HISAW-ZARROW :72) est en général accompagnée par l'assouplissement des autres ligaments de la ceinture pelvienne, tels que le sacro-sciatique. Tous ces effets cumulés permettent une augmentation du diamètre interne du bassin osseux et le passage du foetus. Chez la vache, le relâchement des ligaments sacro-sciatique et sacro-tubéral produit un léger effondrement du bassin, d'où élévation

apparente de la base de la queue. Ceci constitue un prodrome d'accouchement observé par les éleveurs depuis longtemps déjà : la vache "se casse".

On ne possède que peu de preuves en ce qui concerne l'intervention de la relaxine sur les différents ligaments du bassin, mais son rôle est bien prouvé lors de la séparation pubienne chez certaines espèces ; cobaye, souris, campagnol, singe rhésus.

a. le Cobaye

Les études histologiques de RUTH (120-121) ont révélé que chez le mâle, la plaque de cartilage hyalin existant entre les os pubiens à la naissance est presque complétement remplacée par de l'os et du tissu conjonctif orienté sans direction précise chez l'adulte. Au contraire, chez la jeune femelle non gestante, la symphyse pubienne reste cartilagineuse, puis elle est graduellement mais incomplétement remplacée par du tissu conjonctif au fur et à mesure que l'animal vieillit.

Ce n'est qu'à partir du 35e jour de gestation (qui dure 68 j) que la mise en place progressive d'une vascularisation peut être détectée, s'accélérant rapidement durant les 2 dernières semaines de gestation. Concommitemment, le ligament interosseux s'élargit et la résorption des faces symphyséales des os iliaques s'amorce. Vers la 8e semaine on constate que les cavités médullaires se sont ouvertes sous l'effet de l'érosion. Un élargissement progressif du ligament avec hyperplasie des fibroblastes associés se poursuit et il apparait des ostéoclastes dans les lacunes de l'os en résorption. Il s'ouvre ainsi de vastes lacunes médullaires remplies de tissu conjonctif fibreux en continuité avec celui du ligament. Pendant la dernière semaine de gestation, l'orientation des trousseaux de fibres collagène passe de la direction antéropostérieure à la direction transversale. Il s'ensuit un allongement du ligament pubien qui passe de 5,5 mm à 5 j avant part, à 17 mm le jour de l'accouchement (WAHL & Coll : 150). Ainsi le foetus d'un diamètre moyen de 20 mm peut-il être expulsé à travers un bassin qui, chez la femelle non gravide a un diamètre intérieur de 11 mm environ. Après accouchement, il y a régression rapide du ligament au 1/3 de sa longueur dans les 3 jours post partum. L'os est reconstitué et 14 j après part, le pubis est revenu à son état initial.

HISAW (68-69) réussit à provoquer ces changements chez une femelle non gestante par administration de sérum d'une femelle en fin de gestation, la mobilisation de la symphyse pubienne pouvant être décelée 6 à 8 heures après injection. Mais DEFREMERY & Coll (47) montrent que l'on peut aussi provoquer la séparation de la symphyse pubienne du cobaye castré par les seuls oestrogènes, ou par un mélange d'oestrogènes et de progestagènes. (HISAW-ZARROW-72).

Il s'en résulta un certain nombre de recherches, se proposant de savoir si la séparation pubienne induite par les stéroïdes était différente de celle induite par la relaxine.

Pour résumer ces travaux de façon synthétique, notons que :

- la progestérone seule provoque la séparation pubienne chez le cobaye dans un délai de 72 heures : HISAW & Coll (73)

- explication de ce phénomène par HISAW (73) et ZARROW (156) : on peut détecter de la relaxine dans le sang d'un cobaye castré soumis aux oestrogènes et à la progestérone, mais pas chez les animaux ayant en plus été hystérectomisés : la présence de l'utérus est indispensable à la sécrétion secondaire de relaxine.

- d'après COURRIER (24) seuls les oestrogènes peuvent provoquer la séparation pubienne sur les animaux ovario-hystérectomisés mais le résultat n'est visible qu'après 26 jours de traitement, par ailleurs, seule la relaxine est à même de reproduire une élongation aussi importante que celle observée lors d'un accouchement normal.

On en déduit que le mécanisme d'action des seuls stéroïde nonobstant le rôle des progestagènes sur la sécrétion de relaxine par l'utérus, est différent de celui de la relaxine, bien qu'on ne soit pas allé très loin dans la compréhension respective des deux mécanismes.

Des études histologiques et histochimiques ont montré que la quantité de collagène qui compose le ligament interpubien (environ 70 % de sa masse) augmente durant les transformations pré partum, de même que la quantité d'eau d'imbibition du tissu considéré (WAHL & Coll :150). On en déduit que la relaxine, associée aux oestrogènes, stimulait la synthèse de collagène, la présence de petits paquets de fibres collagène étant alors interprétée comme le signe d'une néoformation plutôt que d'un clivage des fibres préexistantes (147). Mais on note aussi une augmentatio de la quantité d'hydroxyproline libre. Il y a donc en même temps synthèse et dégradation de collagène avec prédominance des phénomènes anaboliques avant l'accouchement, favorisés par une augmentation des oestrogènes les 2 ou 3 derniers jours. Les études de WAHL & Coll (150) ne rendent pas la relaxine responsable d'une inhibition de la collagénase avant accouchement. Ce serait plutôt la progestérone qui inhiberait l'enzyme en question. Après accouchement, la chute brutale du taux de progestérone, avec en même temps baisse du taux d'oestrogènes et de relaxine, induit une augmentation de l'activité collagénase, partant, une augmentation des phénomènes cataboliques conduisant en 5 jours post partum à un retour du ligament à son état initial. Une fois déclenchée, la séparation pubienne ne peut être maintenue ni par la relaxine exogène (de porc), ni endogène (sans qu'il y ait production d'anticorps antirelaxine). (148).

La symphyse pubienne passe donc par un état réfractaire après quelques jours de stimulation continue par les oestrogènes et la relaxine, avec réduction sensible de l'espace interpubien.

b. La Souris

L'étude de la séparation pubienne a été plus approfondie que chez le cobaye (26-27-28-29). Chez le mâle la symphyse reste toujours cartilagineuse alors que chez la femelle, le cartilage est remplacé par un ligament conjonctif. Chez la femelle gestante, la séparation a lieu par résorption des faces médiales des os pubiens et allongement du ligament. Ceci débute à J 12 de gestation et peut être détecté in vivo comme une légère mobilité de la symphyse pubienne. Il y a prolifération du cartilage pubien et il s'en suit un éloignement des os. A J 15 de gestation, la brèche s'élargit jusqu'à mesurer 1 mm. les os sont réunis par un ligament fibro-cartilagineux. La séparation se poursuit jusqu'à créer un espace de 5,5 mm le jour du terme. Comme chez le cobaye, il y a ouverture des cavités medullaires et présence de fibroblastes au contact de l'os mais la néovascularisation de ces zones n'y a pas une importance aussi marquée.

On peut obtenir un effet quasi identique à ce qui se passe en fin de gestation normale, par injection de relaxine à une souris castrée et préparée par les oestrogènes, tant en dimensions qu'en caractéristique histologiques. La séparation maximum se produit 16 à 18 heures après traitement. Comme chez le cobaye, les oestrogènes seuls provoquent la séparation chez la souris (57) mais des doses élevées sont nécessaires et la cible n° 1 de l'activité des oestrogènes semble être l'os.

D'après CRELIN & HAINES (39) les oestrogènes stimulent l'ostéolyse sur la symphyse pubienne alors que dans tous les autres tissus osseux du corps de l'animal, leur effet va dans le sens d'une ostéogénèse marquée. Par contraste, l'effet de la relaxine porte sur le cartilage interosseux le transformant en conjonctif ligamenteux, et sur le ligament en stimulant son allongement (MANNING & Coll : 94).

GARDNER, en 1936 (53) montre que la relaxine seule n'a peu ou pas d'effet sur le pubis de la souris femelle castrée alors que les oestrogènes seuls provoquent la séparation pubienne sur la souris ovario-hystérectomisée et même sur la souris mâle castrée. Donc, dans ce cas, pas de production de relaxine endogène en réponse à l'injection d'oestrogènes. Le rôle respectif des oestrogènes et de la relaxine sur la symphyse pubienne de la souris n'est pas clairement expliqué. Si l'on pouvait proposer un mécanisme simple chez le cobaye, c'est loin d'être le cas chez la souris où d'autres hormones doivent jouer un rôle :

- la progestérone, contrairement à ce qui se passe pour le cobaye inhibe la séparation pubienne (58)

- la thyroxine (75) semble indispensable lors de la séparation pubienne : la réponse à la relaxine, abolie par le thiouracile (qui bloque la sécrétion de thyroxine) peut être restaurée par administration simultanée de thyroxine.

- l'hormone de croissance : chez les souris hypophysectomisées, on ne peut produire la séparation pubienne par la relaxine plus les oestrogènes qu'à un faible degré, le plein effet étant rétabli par injection de G.H. (140-143).

A ce stade de recherches, STEINETZ & MANNING en 1967 (144) proposent le mécanisme suivant : les oestrogènes, en synergie avec la G.H. induisaient au niveau des lysosomes la synthèse d'enzymes dans les cellules des os et du cartilage, et la relaxine provoquerait la rupture des membranes lysosomiales.

Tous ces travaux furent réalisés à base d'extraits de relaxine peu purifiés, mais de récentes découvertes, utilisant l'hormone pure, tendent à confirmer ces résultats, éliminant la possibilité que certains phénomènes soient dus à des molécules annexes polluant la préparation (21) (132).

c. autres espèces

Chez la femme enceinte, la relaxation des ligaments pubiens a bien lieu normalement à l'approche du terme (10 mm environ) et la fermeture est complète 4 à 5 mois après le part (2). De même, on note parfois un manque de cohésion du pubis chez certains nouveau-nés. Le fait de savoir si ces phénomènes sont à mettre en rapport avec la relaxine reste toujours du domaine de la recherche et rien n'est prouvé bien qu'on ait détecté la présence de relaxine dans le sérum de femme enceinte depuis 1955 (ZARROW & Coll : 160).

DECAMILIS & POZZIE (18) en 1961, ont remarqué par radiographie, la dilatation de la symphyse pubienne chez 16 femmes parmi 20 ayant reçu de 40 à 60 mg de relaxine.

Les preuves du rôle de la relaxine dans la séparation du pubis chez le singe Rhésus (MACACCA MULATTA) ont été rapportées par HISAW en 1964 (70) sans toutefois donner de précisions quantitatives.

LEITCH & Coll (86) ont dressé une liste concernant les proportions entre le poids du foetus et celui de la mère chez de nombreuses espèces, lors de l'accouchement. Si on estime qu'il peut exister une bonne corrélation entre ce rapport et celui concernant les dimensions du produit par rapport au diamètre du bassin maternel, on constate que chez les animaux ou le rapport est supérieur à 6 % (cobaye, souris...) on a des phénomènes de relaxation pubienne alors que chez le rat, le lapin et l'homme, le rapport est inférieur à 6 % et l'on ne peut pas mettre formellement en évidence ce type de phénomènes.

Par contre, dans cette liste, il existe des animaux ayant un rapport foetomaternel supérieur à 6 % : le Tarsier (Tarsius Spectrum) : 21 %, la grande et la petite chauve-souris Rhinolphe

et leurs sous espèces : 34 %, le marsouin (Phocaena Phocaena) : 13 %, loutre de mer (Enhydra Lutrus) : 10 % ....ON ne sait pas s'il y a séparation pubienne dans ces espèces, mais on peut le supposer.

2. Action sur le col de l'utérus

La participation probable de la relaxine à l'assouplissement du col à terme justifie les recherches entreprises ces dernières années. La maturation cervicale est indispensable lors de l'accouchement, et par ailleurs un col étanche et parfaitement occlus représente un inconvénient majeur dans les transplantations d'embryons chez la vache ou l'avortement thérapeutique chez la femme. La dilatation forcée du col dans l'espèce humaine pendant les trois premiers mois de gestation peut être cause de dysfonctionnement cervical pendant les grossesses ultérieures (117). Un produit permettant l'ouverture du col en quelques heures serait d'un intérêt majeur en obstétrique humaine aussi bien que vétérinaire.

a. chez la Vache

En 1953, GRAHAM & DRACY (55) ont les premiers évoqué les effets de la relaxine sur le col à l'occasion de travaux sur les transplantations d'embryon dans cette espèce. En injectant des doses de 8 500 GPU d'hormone à des vaches prétraitées aux oestrogènes (D.E.S.) mais à des quantités suffisemment faibles pour n'avoir pas d'effet sur le col, ils ont montré que l'on peut assouplir le col, l'ouvrir mécaniquement in vivo au moyen d'un dilatateur calibrable. Chez les vaches traitées avec la relaxine, le col restait dilatable 5 jours après l'oestrus date à laquelle il aurait normalement dû être rigoureusement fermé.

Dans une étude histologique, EGGE & DRACY (37), montrent que sur des vaches prétraitées au DES et à la progestérone, la relaxine provoque une élongation très nette du col.

b. chez la Truie

En 1956, ZARROW & Coll (161) obtiennent des résultats similaires chez la truie : 5 mg par jour pendant 7 jours de D.E.S associés à 30 000 GPU de relaxine trois fois par jour durant les quatre derniers jours, produisent un maximum de dilatabilité : 2,5 cm de diamètre par rapport aux 6 à 10 mm chez le témoin. Les oestrogènes seuls ou le mélange oestrogènes-progestagènes n'ayant pas d'effet sur le col, la truie ne semble donc pas produire de relaxine endogène en réponse aux stéroïdes..

c. chez les Primates

Une injection intraveineuse de 18 000 GPU de relaxine porcine chez la femme à une période du cycle où le taux d'oestrogènes plasmatiques est maximal, reste sans effet notable (139).

Mais chez la femme enceinte, les résultats sont différents STONE & Coll (146) obtiennent des résultats positifs, en recherchant l'induction du travail par la relaxine de porc, chez 72 % des 62 parturientes soumises à l'expérience. WALCZAK (151) affirme que dans les 3 à 5 minutes suivant la mise en place d'une perfusion de relaxine, il se produit une maturation progressive et uniforme du col chez 375 patientes (pas de témoins étudiés) et Mc LENNAN (91) dans un test en double aveugle avec randomisation sur 60 femmes, dont 30 témoins, observe une action très significative de la relaxine sur l'induction du travail et la maturation du col, la relaxine étant dans ce cas incluse dans un gel déposé au contact direct du col par voie vaginale. De façon strictement qualitative HISAW (70) déclare observer un assouplissement du col de la guenon Rhésus non gestante, après traitement oestro-progestatif, mais l'effet serait bien plus prolongé si on y ajoute de la relaxine. Mais comme chez les rongeurs, les résultats sont minimes comparativement à ce qui se passe chez les animaux gestants, et comme l'on connait les effets anabolisants des oestrogènes et des progestagènes sur certains tissus, on a pensé que cette augmentation de la dilatibilité pouvait être due seulement à une augmentation des dimensions du col lui-même.

d. chez la Brebis

On connait l'importance de la non-dilatation cervicale en obstétrique dans cette espèce (Ring-womb). D'après HINDSON & Coll (67) on peut provoquer ce phénomène par une seule dose massive d'oestrogènes. FITZPATRICK (45) prouve que les prostaglandines jouent un rôle lors de l'assouplissement du col. Mis à part ces travaux, peu de chose a été précisé sur l'action de la relaxine dans cette espèce si ce n'est que des doses de 100 à 12 500 GPU de relaxine porcine ne permettent pas d'ouvrir suffisemment le col d'une brebis non gestante pour y introduire la pipette d'insémination (122).

e. chez les Rongeurs

Chez la ratte, l'extensibilité du col augmente graduellement mais de façon non linéairedu 11-12e jour de gestation jusqu'à l'accouchement (21 j. de gestation dans cette espèce) (159) d'où à terme une tension de rupture du col plus faible comparativement à ce qui est mesurable sur les animaux non gestants où à moitié de gestation, ce qui est dû au fait que la trame conjonctive est plus lâche dans le col en fin de gestation. Si l'on peut assurer une survie foetale de 72 % chez la ratte gestante

ovariectomisée à J 12, par une injection quotidienne de 2 mg de progestérone, on ne note pas les modifications de poids et de consistance du col qui devraient se produire vers le 20e jour. Avec le 17 B oestradiol (0,1 à 0,2 µg/jour) en plus, la survie foetale est portée à 90 % et on augmente l'extensibilité cervicale. Mais ce n'est qu'en ajoutant de la relaxine à ce cocktail hormonal que l'on arrive à reproduire ce qui se passe normalement. Cette même combinaison d'hormones injectée 8 jours de suite à des rattes castrées mais non gestantes, arrive à augmenter de façon indiscutable l'imbibition hydrique et l'extensibilité cervicales mais sans parvenir toutefois à provoquer les phénomènes constatés en fin de gestation normale.

Les travaux de KENNEDY (81) montrent qu'une injection de 10 à 100 GPU de relaxine porcine provoque dans un délai de 12 à 15 heures, l'évacuation par voie vaginale de fluides accumulés dans l'utérus sous l'effet d'un traitement préalable au 17 B oestradiol.

Résultats similaires obtenus chez la souris (87). Les traitements par les stéroïdes plus la relaxine, sans avoir l'efficacité que l'on observe chez la ratte, provoquent des phénomènes histologiquement comparables à ceux de l'accouchement normal : éparpillement et éclatement des fibres collagène qui sont vaguement disposées dans une substance fondamentale devenue plus abondante. Ici aucune modification histologique ne peut être attribuée à l'action de la relaxine seule. La synergie avec les stéroïdes est indispensable. NAGAI (97) montre que la résistance du col au passage des fluides venant de l'utérus est réduite chez la souris "vierge" ayant reçu soit 5 ug de dipropionate d'oestradiol, soit 10 GPU de relaxine, soit les deux. FIELDS & LARKIN (42) confirment ces résultats en précisant qu'il n'existe pas de concordance entre la dose qui provoque l'extensibilité cervicale et celle qui détermine la séparation pubienne de la souris sans pouvoir expliquer ce phénomène.

On peut noter que la dilatabilité maximale du col chez la truie (136) et chez le hamster (99) a lieu au moment où la concentration plasmatique de relaxine est aussi à son maximum. Il n'y a pas nécessairement de relation de cause à effet entre ces deux observations, mais la coïncidence est troublante.

On ne sait pas comment la relaxine provoque la maturation du col, mais son effet sur la synthèse du collagène qui a été montré dans la symphyse pubienne n'est certainement pas applicable ici.

Pour DANFORTH & Coll (34), il y a dans le col de la femme au moment du terme, une dégradation importante du collagène bien que le poids total du col ait augmenté par imbibition d'eau et adjonction d'autres éléments, la quantité de collagène diminue en valeur absolue ; les auteurs pensent alors que la relaxine aurait une action spécifique sur les fibroblastes du col, provoquant un remodelage du conjonctif cervical.

3.. Action sur l'utérus

a. l'utérus en général

STEINETZ & Coll (142) ont noté qu'il se produisait une imbibition rapide et importante d'eau dans l'utérus d'une ratte castrée et pré-oestrogénisée, après injection de 15 GPU de relaxine (10). On assiste à un maximum d'imbibition d'eau 6 heures après injection et le retour à la normale s'amorce 8 heures après injection.

Le poids sec de l'organe augmente aussi en même temps (voir figure 5). Plus intéressant à noter est le fait que la quantité de glycogène dans l'organe augmente, atteignant un maximum 12 à 24 heures après l'injection, c'est-à-dire beaucoup plus rapidement que sous l'effet d'une injection d'oestrogènes qui manifeste cet effet en 48 heures. HALL (61) précise que la majeure partie du glycogène se trouve concentrée dans le myomètre.

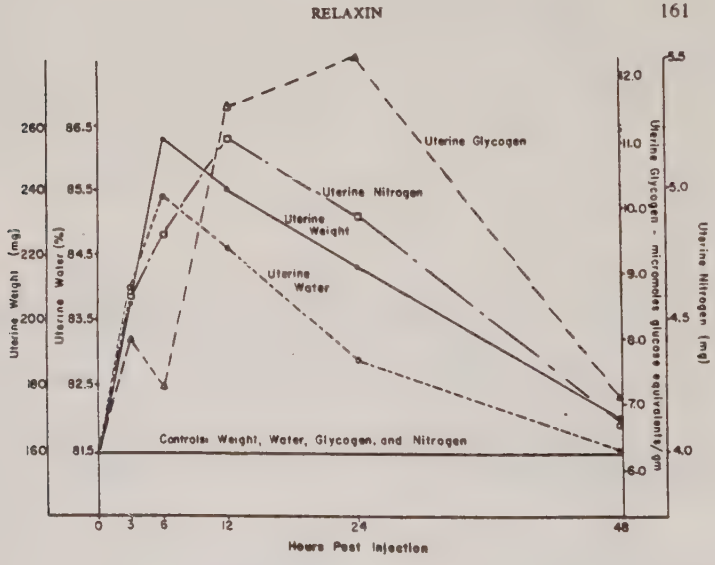


Figure 5 - Changements dans la composition de l'utérus provoqués par la relaxine chez la ratte ovariectomisée
Les animaux castrés à J 0 reçoivent 5 ug de cyclopentyl propionate d'oestradiol à J 7 et 15 GPU de relaxine à J 14.

D'après STEINETZ & Coll (142) - 1957

Des effets comparables sont observés chez la souris (84). D'autres travaux (125) montrent que la relaxine agit sur plusieurs systèmes enzymatiques : phosphorylases, transglycosidase, uridine de phosphate - glucose - glycogène transférase, phosphatases acide et alcaline. Les enzymes du métabolisme glycogénique sont situées dans le myomètre, alors que les phosphatases sont plutôt localisables dans l'endomètre.

b. le myomètre

C'est cette propriété d'inhiber le myomètre qui fut la base d'un dosage biologique comme on l'a vu précédemment (83). L'injection d'extraits aqueux d'ovaire de truie à des cobayes pré-oestrogénisés peut aussi inhiber l'activité mécanique des fibres du myomètre in vivo. Ces effets ont été confirmés chez d'autres espèces : rat (123 souris (154) cobaye (39) (106) et hamster (124).

La relaxine agit rapidement in vivo et in vitro, contrairement à la progestérone qui nécessite un temps de latence de 8 à 12 heures (105) de plus, elle abolit toute activité spontanée du myomètre en réduisant la fréquence des contractions (107) mais laisse celui-ci capable de contractions en réponse à des stimuli mécaniques ou chimiques : ocytocine, prostaglandines (PG F2α) (96), contractions dont l'amplitude semble peu modifiée.

Ceci diffère totalement de l'action de la progestérone où la quiescence du myomètre entraîne un caractère réfractaire quasi total à l'ocytocine (126). Ainsi, la relaxine semble produire une inhibition subtile en réduisant l'activité spontanée des cellules musculaires sans affecter leur excitabilité. On ne sait pas ce qui est à l'origine de l'activité spontanée du myomètre mais il est probable que le mécanisme de base est le même que celui qui est à l'origine de l'activité stimulée. Dans leur expérience sur des rats anesthésiés, PORTER & DOWNING (111) montrent que, une fois les contractions spontanées inhibées par l'action des oestrogènes, la relaxine supprime l'activité provoquée par une perfusion de prostaglandines. Elle semble dans ce cas en être l'antagoniste direct.

chez la femme : la relaxine de porc n'a pas d'effet sur l'utérus in vitro (96). Mais sachant que l'on pouvait administrer de fortes doses de relaxine chez l'homme sans danger (103), on a procédé à de nombreuses expériences in vivo (voir PORTER & FINN-(44) pour bibliographie complète.)

Au début les doses employées étaient trop faibles. Par pilules, une dose de 6 à 10 000 GPU est nécessaire pour obtenir un taux plasmatique dit "physiologique" de relaxine, même pour un bref instant.

Avec des doses de 60 à 70 x 10^3GPU de relaxine répétées toutes les 2 heures, EICHNER & Coll (38) notent que l'activité du muscle utérin est réduite chez les 15 femmes étudiées pendant leur accouchement ; mais leur technique de tocodynamométrie utilisée pour mesurer cette activité était peu sensible et cette expérience ne fut pas vérifiée. Par contre, dans une expérience bien contrôlée (90) portant sur 15 femmes présentant des symptômes d'accouchement prématuré, des doses de 120 000 GPU provoquent soit une baisse de fréquence des contractions, soit leur arrêt complet (cliniquement prouvé) et la gestation se trouve prolongée. De même, FOLSOME & Coll (46) montrent que l'on peut, par des doses de 354 000 GPU, supprimer le travail prématuré chez 23 femmes sur 40 traitées, et le travail au momentdu terme chez 7 parturientes sur 18.

Chez la femme non gestante, où l'activité utérine est mesurée par une sonde, on remarque que sur 50 sujets soumis à 15 000 GPU en moyenne, l'activité se trouve fortement réduite chez la plupart, mais qu'après des doses répétées, la réponse devient faible ou nulle.

En 1963, BRET (11) déclare que dans 61 % des cas de menace d'accouchements prématurés traités par injections de relaxine, la gestation peut être poursuivie jusqu'à terme.

Toutes ces études ne prouvent pas clairement que l'effet de la relaxine s'exerce bien sur le myomètre, mais la relation de cause à effet semble évidente. Du point de vue biochimique, le mécanisme de l'action de l'hormone sur l'utérus n'est pas précisement connu.

RUDZIK (118-119) pense que la relaxine exerce son action sur la musculature lisse de l'utérus par l'intermédiaire des catécholamines, car les substances qui empêchent la larguage synaptique de l'adrenaline empêchent aussil'action de la relaxine sur l'utérus. Il existerait dans cet organe une relation inverse entre quantité d'adrenaline et sensibilité à la relaxine.

PATERSON (102) affirme le contraire puisque pour lui, l'action de l'adrénaline sur l'utérus du rat se trouve fortement sous l'influence des B recepteurs puisque le pronéthanol, spécifiquement B bloquant, supprime l'action de l'adrénaline sur l'utérus mais que ce même produit ne modifie pas l'action de la relaxine.

En fait, de récentes recherches de PORTER & DOWNING (112) (109) conduisent à penser qu'il y aurait intervention simultanée des deux types de récepteurs (α et B) inhibiteurs, en dépit du fait que l'effet inhibiteur B soit prédominant, ou bien alors, il se pourrait que l'intermédiaire de la relaxine sur l'utérus soit la dopamine plutôt que l'adrénaline.

Chez le lapin, les injections de relaxine porcine n'ont pas réussi à reproduire les effets d'inhibition de la motricité utérine observée ailleurs mais on connait la spécificité rigoureuse de cette espèce où la réponse n'est sensible qu'avec l'hormone endogène. Par une élégante série d'expériences de circulation croisée entre lapines gestantes et non gestantes, PORTER (108) montre, chez la lapine gestante, la présence d'un facteur utéro-inhibiteur pour la non-gestante. Or, ce facteur est présent au moment où le taux de relaxine endogène est au plus haut (J 20-J 29).On a montré aussi que chez la lapine, la relaxine spécifique circulante est solidement liée à d'autres protéines la protégeant de l'excretion et de l'inactivation rendant en même temps son analyse beaucoup plus difficile. Une relaxine de porc injectée au lapin telle quelle sera donc rapidement éliminée ou inactivée.

Chez la ratte, PORTER (323) en reproduisant les expériences de circulation croisée à retrouvé le rôle inhibiteur de la relaxine vis à vis des contractions utérines.

c. l'endomètre

Ce type d'activité a été mis en évidence par HISAW (70) travaillant sur le singe Rhésus. Les guenons ovariectomisées sont soumises à l'action des oestrogènes, de la progestérone et de la relaxine. On étudie après chaque traitement le rapport myomètre/endomètre mesurable sur une section d'utérus : il est de 3 à 10 chez les animaux intacts ou n'ayant reçuque des oestrogènes, de 2 sur les animaux ayant reçu oestrogènes + progestérone, de 1 si, en plus, on ajoute la relaxine au traitement. A remarquer qu'un excès d'oestradiol bloque cet effet.

En reproduisant le même type d'expériences avec les trois hormones, HISAW & Coll (56) montrent que la relaxine, seule ou en synergie avec les stéroïdes sexuels, a un effet plus précis sur l'endothélium des vaisseaux sanguins de l'endomètre. On qualifie cet effet de "cytomorphose épithélioïde" car les cellules endothéliales y prolifèrent de façon importante, puis les vaisseaux entrent en coalescence jusqu'à former des sinus.. Ces phénomènes sont les mêmes que ceux qui se produisent normalement à l'endroit de la muqueuse utérine où les embryons s'implantent dans l'endothélium. Cet effet peut être obtenu à des doses ou avec des combinaisons de faibles quantités d'hormones ne provoquant pas par ailleurs la croissance de l'endomètre dans sa totalité.. On peut penser qu'une des fonctions de la relaxine serait de préparer les vaisseaux de l'endomètre à nourrir le foetus.

d. la trame collagène et l'extensibilité de l'utérus

CULLEN & HARKNESS (32) étudient l'effet combiné des stéroïdes et de la relaxine sur la trame collagène de l'utérus

de rattes ovariectomisées. Les animaux traités avec l'ensemble : 17 B oestradiol + progestérone + relaxine montrent l'accroissement le plus marqué du réseau de fibres collagène de l'organe, accompagné d'une augmentation remarquable de l'extensibilité de l'organe. Le collagène lui-même n'étant pas extensible, l'augmentation de taille doit nécessairement s'accompagner d'un accroissement de la quantité d'élastine et d'une réorientation des faisceaux de fibres. Un tel effet serait à rapprocher de ce que l'on a déjà observé sur le col.

4. Action sur le vagin

La relaxine potentialise l'action du 17 B oestradiol qui provoque la kératinisation de l'épithélium vaginal chez la ratte et la souris, mais seule, elle est incapable de produire de semblables effets (35). En 1960, HALL (61) note que des extraits de relaxine ont un effet antagoniste à l'action de la progestérone qui, elle, favorise la production de mucus par le vagin de la souris.

Chez des cobayes ovariectomisés, il a été noté que des extraits bruts de relaxine peuvent provoquer l'ouverture de la membrane vaginale (78).

5. Action sur la mammelle

Comparativement à ce que l'on a déjà noté à propos d'autres organes, cet effet se manifeste lorsque l'on fait agir la relaxine en synergie avec les stéroïdes sexuels. Il y a augmentation de la croissance et de la lobulation de la glande mammaire chez la ratte ovariéctomisée avant maturation sexuelle, bien plus importante que ce que l'on peut provoquer avec un mélange oestro-progestagènes seuls (64). Par la suite, HARKNESS & ANDERSON (65) montrent que la relaxine porcine seule ou combinée avec les stéroïdes, augmente la quantité d'ADN dans la glande mammaire du rat et de la souris. Même effet synergique stéroïdes + relaxine chez le cobaye et le lapin (54).

Ces expériences furent reproduites plus récemment (1977) (66) avec une hormone purifiée, et on a remarqué à cette occasion que c'était l'association relaxine + oestrogènes + progestérone + prolactine qui produisait la maximum d'effet sur la croissance de la glande. Par ailleurs, on a montré dans une étude sur les carcinomes mammaires du rat provoqués par une substance chimique, que la relaxine administrée quelques semaines après le carcinogène avait un effet d'amplification de croissance sur la tumeur (104).

A cet effet univoque sur la croissance des lobules, seule la chèvre semble échapper. Chez cette femelle, la relaxine provoque au contraire, une réduction de la quantité du tissu sécrétaire. (25).

A contrario, il a été prouvé que, si la relaxine exerce un effet stimulant de la croissance des cellules acineuses, elle exerce un effet nettement inhibiteur sur la sécrétion lactée par les acini. On en veut pour preuve la chute du taux d'ARN présent dans la mammelle en réponse à l'administration de relaxine aux animaux (65).

C.SOURCES ET CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE RELAXINE

De nombreuses espèces ont fait l'objet de recherche de relaxine aussi bien dans le plasma que dans les autres tissus, avant les années 1960 (voir HALL 1960 (60) pour bibliographie complète), grâce aux dosages biologiques. La mise au point des méthodes radio-immunologiques a permis d'affiner et d'étendre ces recherches.

1. chez la truie

Cet animal fut à la base des recherches sur la relaxine ; en effet, on en trouve dans les ovaires pendant la gestation, de 1 000 à 10 000 GPU par gramme de tissu frais. La majeure partie étant localisée dans le corps jaune qui apparaît donc comme le lieu l'élaboration et de stockage du produit.

Les recherches sur cet organe, en microscopie electronique (7) montrent la présence de nombreux granules intracytoplasmiques, dans les cellules lutéales, qui sont délimités par une membrane et présentent la particularité d'être acido-phosphatase négatifs. Ces granules n'existent pas de façon suivie au cours du cycle. Pendant la gestation, on en trouve que peu jusqu'à J 20, mais à partir de J 28 leur présence est constante puis leur nombre augmente jusqu'à J 110 pour atteindre un maximum et décroître par la suite. Un jour avant accouchement certaines cellules s'en trouvent dépourvues et 6 heures avant part, la plupart des cellules lutéales n'en possèdent plus. On pense que ces granules contiennent la relaxine puisqu'il existe un parallèle entre leur nombre dans les cellules du corps jaune gestatif et l'efficacité des extraits de ce corps jaune dans les dosages biologiques sur la symphyse pubienne de la souris. Il s'agirait alors d'un stockage cytoplasmique de relaxine dont la synthèse aurait lieu au niveau du reticulum endothélial rugueux des cellules lutéales et qui serait véhiculée ensuite par l'appareil de Golgi.

Cette hypothèse fut confirmée par les études immunocytochimiques de KENDALL & Coll (80) et par les tests en immunofluorescence de LARKIN & Coll (85) qui précisent que la fluorescence à la relaxine ne peut être détectée sur la coupe d'ovaire qu'au niveau des cellules lutéales.

Des extraits de liquide folliculaire de kystes ovariens ont présenté une positivité au test radioimmunologique (95) aussi bien chez les truies pré pubères (en faible quantité) que chez les truies sexuellement mures, ou même gestantes (en quantité plus importante). Mais on ignore encore à ce jour, quel type de cellule serait responsable de la synthèse de cette hormone.

En étudiant la concentration en relaxine dans le sang des veines ovariennes, 40 à 26 heures avant accouchement, BELT (7) et SHERWOOD (134) confirment que la dégranulation des cellules lutéales s'accompagne d'une augmentation plasmatique de la concentration de l'hormone.

Figure 6 - Concentration plasmatique de relaxine chez la truie en fin de gestation (chaque barre représente la moyenne avec l'intervalle de confiance pour 6 truies. Les astérisques indiquent les valeurs qui diffèrent significativement de la précédente.)

D'après SHERWOOD - 1975 (134)

Les concentratins au début de la gestation sont basses (0,1 à 0,2 ng/ml) pendant les 100 premiers jours.

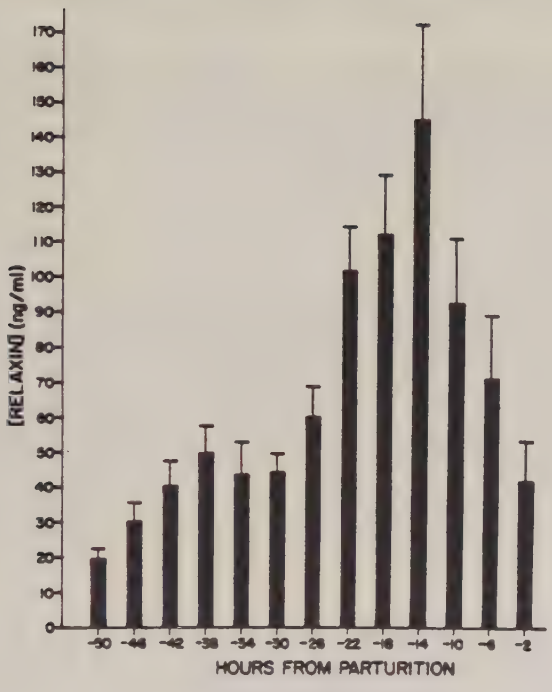


Figure 7 - Concentrations de relaxine dans le plasma de truie dans les heures précédant l'accouchement.

D'après SHERWOOD - 1975 (134)

La production de relaxine par le corps jaune n'est pas modifiée au cours du temps par administration de progestérone, mais on peut accélérer la sécrétion de l'hormone avant accouchement par injection de PG F2α à J 112, traitement d'effet lutéolytique bien connu. Dans les 45 minutes suivant l'administration de PG F2α le taux de relaxine monte de 20 à 100 ng/ml (135-136) ; l'accouchement qui a lieu alors 37 heures après injection des prostaglandines n'est plus annoncé que par un faible accroissement de la concentration de relaxine.

Au moment de l'accouchement normal, la concentration sérique a déjà fortement baissé (3) et quoiqu'il se manifeste une succession de pics de sécrétion, on ne peut pas les mettre en relation avec l'expulsion des porcelets, mais la tétée, elle,

est bien accompagnée par des pics sériques de relaxine bien qu'on ne sache pas d'où vient l'hormone après le part.

En résumé, chez le porc, la relaxine est sécrétée et stockée par le cytoplasme des cellules lutéales de gestation en très petite quantité au début, elle est libérée dans le sang rapidement durant les 24 heures avant accouchement, ceci en relation avec le processus normal de lutéolyse.

2. Chez le Rat

Dès 1958 (9), on trouve des quantités appréciables de relaxine dans l'ovaire de ratte, gestante uniquement, plus précisement à 13,15 et 21 jours de gestation.

En controlant ceci, ANDERSON & Coll (4) montrent en 1973 que la concentration dans l'ovaire de la ratte est faible jusqu J 13 mais augmente à partir de cette date pour culminer à J 21 et redescendre juste avant l'accouchement (J 22) puis la concentration plasmatique reste basse pendant la lactation. Chez la ratte amenée artificiellement (stimulus mécanique) en état de pseudo-gestation, la quantité de relaxine reste continuellement et uniformément basse.

LONG, en 1973 (88) note la présence de granules cytoplasmiques dans les cellules lutéales du rat, dont le nombre augmente jusqu'à J 18. A J 21, ils sont toujours visibles. Bien que ne possédant pas d'activité acido-phosphatase, ces granules ont néanmoins l'activité très spécifique de la relaxine. (5).

En 1965, DALLENBACH-HELLWEG & Coll (33) déclarent avoir détecté, par une méthode d'immunofluorescence, la présence de relaxine dans des cellules de certaines glandes de l'utérus appelées "glandes métriales" à J 15, J 17 et J 19 de gestation. Par la suite, certains auteurs confirment ce fait (4), d'autres non (36). Toujours est-il qu'à partir d'extraits de ces glandes métriales, personne n'est parvenu à mettre en évidence une activité biologique de type relaxine (5).

Les glandes en question sont constituées d'un conglomérat de cellules granulaires, situées entre les couches des muscles lisses de l'utérus dans la région du mesomètre chez la ratte. Elles sont clairsemées à J 10 mais leur nombre augmente rapidement, passe par un maximum à J 15, puis les cellules se nécrosent en libérant leurs granules dans l'espace intercellulaire où la plus grande partie se disperse. Ces granules possèdent de nombreuses enzymes hydrolases dont on peut détecter l'activité par la suite ailleurs que dans les cellules des glandes métriales. PORTER (105) pense qu'il est possible que ces cellules soient une cible pour la relaxine puisqu'on a observé une dissolution marquée de collagène (33) au contact de ces cellules en fin de gestation. Or, on a déjà évoqué l'effet de la relaxine sur la trame collagène de

l'utérus ; cet effet pourrait bien s'exercer par l'intermédiaire des enzymes libérées par les cellules des glandes métriales.

O'BYRNE & STEINETZ (98) ont dosé par radioimmunologie, la relaxine dans le plasma périphérique du rat grâce à une anti-relaxine porcine (voir figure 8) pendant la gestation. Leurs résultats sont en accord avec ceux de PORTER & DOWNING (112) où les expériences de circulation croisée chez le rat montrent qu'il existe dans le sérum de la ratte gestante un facteur inhibiteur de l'activité du myomètre vers J 18- J 21. Un dosage plus récent faisant appel à la radio-immuno -activité spécifique pour la relaxine de rat (137) précise les données du précédent : la relaxine n'est pas détectable dans le plasma jusqu'à J 10, puis elle augmente de façon marquée dans les 4 jours qui suivent pour atteindre une valeur de 50 à 100 ng/ml de J 14 à J 20. A J 21, apparition d'un pic de relaxine vers 140 ng/ml qui semble en relation avec une photopériode, puis chute de concentration jusqu'à moins de 60 ng/ml dans les 12 à 24 h. avant accouchement.

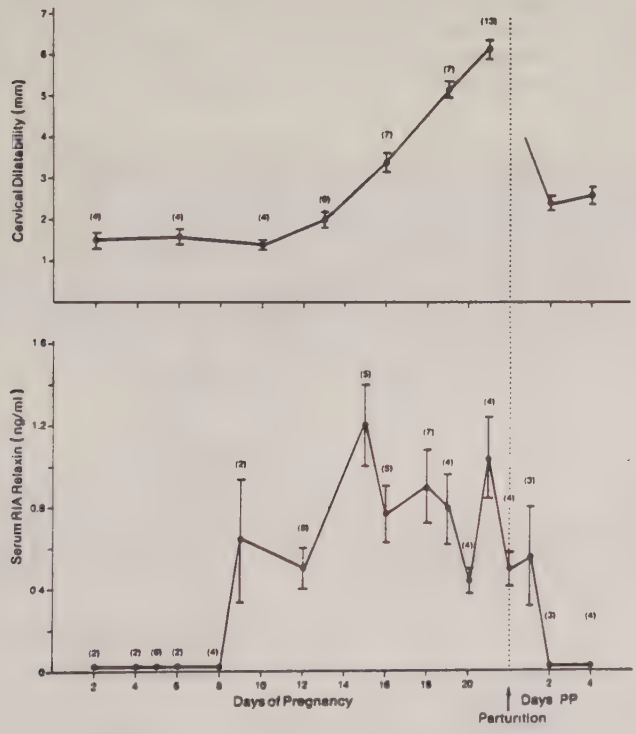


Figure 8 - Concentration sérique de relaxine et dilatabilité cervicale chez le rat pendant la gestation.

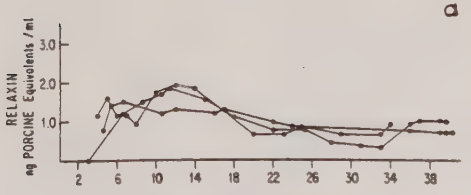
D'après O'BYRNE & STEINETZ - 1976 (98)

3. Chez la Femme

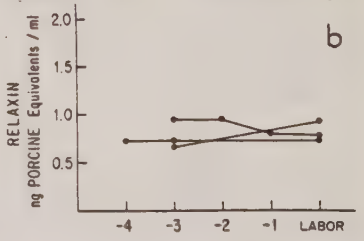
Présence indubitable de relaxine dans le corps jaune de gestation, prouvée par dosage radioimmunologique (100). Les extraits obtenus présentent aussi l'activité sur la symphyse pubienne du cobaye, ce qui confirme les travaux antérieurs relatifs au corps jaune chez la femme. Mais aucune trace de relaxine dans le corps jaune cyclique.

Récemment, BIGAZZI & Coll - 1980 (8) ont réussi à isoler à partir de cultures, in vitro de délivre de femme, une substance ayant les propriétés biologiques et le poids moléculaire (6 000 D) de la relaxine. Les auteurs estiment la concentration à 15-35 GPU/gramme de tissu frais. Découverte confirmée par la suite (155) (43), une première analyse montre qu'il s'agit bien de la molécule de relaxine, avec présence des ponts disulfures, mais que cette hormone diffère sensiblement de la molécule porcine. Bien qu'on ne puisse encore tirer aucune conclusion quant à son rôle, tant au niveau du placenta qu'en ce qui concerne son élimination plasmatique éventuelle, cette découverte relance les possibilités d'étude de la relaxine chez l'homme en permettant d'obtenir de façon commode une hormone utilisable pour un dosage radioimmunologique spécifique aussi bien qu'un produit purifié utilisable in vivo.

En cours de gestation, les dosages de O'BYRNE & Coll (101) et de QUAGLIARELLO (115) montrent un phénomène intéressant : contrairement à ce qui se passe chez le porc ou les rongeurs, la relaxine est présente dans le sang à partir de la 4e semaine de gestation ; il semble y avoir une légère augmentation vers 10-12 semaines puis retour à un plateau constant jusqu'en fin de gestation (schéma n° 9). Pas de pic plasmatique avant accouchement même en réponse à des injections d'ocytocine ou de prostaglandines (74).



SEMAINES DE GESTATION



JOURS PRECEDANT LE TRAVAIL

Figure 9 - Concentration sérique de relaxine chez la femme

A - durant toute la gestation
B - avant et pendant l'accouchement.

D'après QUAGLIARELLO (115)

En 1979, QUAGLIARELLO (115) remarque qu'il existe un parallèlisme entre les modalités de sécrétion d'HCG et de relaxine pendant la grossesse. En poursuivant ses travaux (116) il montre que l'HCG est capable de provoquer la sécrétion de relaxine chez la femme non gestante. Un stimulus par HCG inefficace sur un corps jaune cyclique de 2 ou 3 jours, est inefficace, mais si ce corps jaune est âgé de 8 à 10 jours, le même stimulus réussit à provoquer la sécrétion lutéale de relaxine.

D'après l'auteur, il se pourrait que relaxine et progestérone aient dans ce cas une activité synergique dans l'établissement de la quiescence utérine en début de gestation.

BRYANT & Coll (13) ont noté des variations de concentration plasmatique de relaxine au cours du cycle menstruel chez la femme et un rythme circadien, avec pic sérique le matin et un taux très bas en début de soirée (16). On ne voit pas quelle peut être la signification de ces variations, mais nous avons évoqué plus haut les problèmes de fiabilité des dosages de BRYANT (12) en expliquant comment sa méthode était sujette à caution. Aussi, doit-on considérer ces deux résultats avec la plus extrême circonspection.

4. Chez le Lapin

Présence de relaxine confirmée dans l'ovaire (158) encore que d'après les auteurs cette source n'est pas la principale puisqu'ils trouvent la relaxine dans l'endomètre à des concentrations (250 GPU/g) bien plus importantes que ce que l'on peut trouver ailleurs. Une ovariectome bilatérale n'ayant d'ailleurs pas pour conséquence la chute du taux plasmatique de relaxine dans cette espèce.

Rappelons les expériences de circulation croisée qui prouvent l'existence de relaxine dans le sang des lapines pleines à J 20 - J 25 - J 29 (PORTER : 108).

5. Chez le Hamster

O'BYRNE & Coll (98) observent une cinétique plasmatique en gestation tout à fait comparable à ce qui se passe chez le porc ou le rat.

6. Chez la Brebis

Les études concernant cette espèce sont hélas rares, alors que l'effet potentiel de la relaxine y est d'un grand

intérêt en médecine vétérinaire. Pas de possibilité de détection d'une quelconque activité type relaxine par le test du ligament pubien chez la souris, dans le plasma durant les deux derniers mois de gestation (63).

Les dosages radioimmunologiques effectués dans cette espèce le furent par la méthode de BRYANT (15-22) dont on connait les inconvénients. Avec les réserves qui s'imposent, on note les résultats suivants :

immunoactivité plasmatique élevée à J 15 et J 16 du cycle ainsi qu'au moment supposé de l'ovulation, 24 heures après le pic de LH. Les quantités plasmatiques seraient plus élevées à J 110 de gestation qu'à J 45. Une augmentation brève et intense aurait lieu au moment de l'expulsion de l'agneau ainsi que pendant la tétée.

Dans l'ovaire de brebis, DUBOIS & DACHEUX (36) ont observé une immunofluorescence spécifique au niveau des cellules lutéales, sans préciser à quel stade de gestation ce phénomène avait été constaté.

7. Chez la Vache

Extraction de relaxine à partir du corps jaune de la vache dans le dernier tiers de gestation, mais pas avant, et pas de détection du produit chez les animaux non gestants (20). Travaux repris et vérifiés par FIELDS & Coll en 1980 (41). Le produit possède bien les propriétés biologiques, le poids moléculaire de la relaxine et réagit de façon positive à l'antisérum anti relaxine porcine.

La relaxine des bovins montre une faible spécificité et ses effets biologiques sont peu intenses. Elle est aussi stockée dans les cellules lutéales.

8. Chez le Mâle

BRYANT, en 1972 (L2) déclare avoir détecté une immunoréactivité à la relaxine dans le sérum du verrat, du bélier, et de l'homme; en dépit de sa méthode dont on connait les inconvénients, elle pourrait bien avoir réellement mis en évidence la présence de relaxine puisque DUBOIS & DACHEUX, en 1978 (36) ont détecté une immunofluorescence positive à la relaxine dans les cellules de Lydig et de Sertoli chez le verrat adulte mais pas chez l'animal prépubertaire, ni chez le cryptorchide.

Etant donné les capacités de sécrétion de stéroïdes par l'épididyme, il est intéressant de constater que l'immuno fluorescence peut aussi se localiser dans les cellules globulaires de la région de la tête de l'épididyme, d'où les questions sur le rapport existant entre la relaxine et la synthèse des stéroïdes sexuels.

LOUMAYE & Coll (89) ont prouvé la présence de la relaxine dans le plasma séminal chez l'homme à des doses variant de 1 280 à 73 000 pg/ml de plasma, sans préjuger ni de l'origine ni de la signification de ce fait.

D. RECEPTEURS DE LA RELAXINE

Dans une étude réalisée in vitro en 1978, Mc MURTY & Coll (92) ont recherché la présence de récepteurs à la relaxine dans différents tissus. Ils ont procédé, sur des extraits tissulaires de différents rongeurs, à la recherche des cibles sur lesquelles pouvait se fixer la relaxine de porc marquée à l'Iode 125. La spécificité de ces sites de fixation se vérifie :

- en montrant que de la relaxine non marquée peut déplacer le marqueur ;

- en montrant que les molécules ayant une analogie structurale avec la relaxine, telles l'insuline et le facteur de croissance de l'épiderme, ne peuvent pas déplacer le marqueur.

Dans ces conditions, la présence de ces cibles spécifiques de la relaxine a été reconnue : dans la symphyse pubienne de la souris, dans des extraits de tissu d'utérus de souris, de symphyse pubienne de cobaye, de col utérin de cobaye et de glande mammaire de ratte. Notons pour ce dernier cas, que la capacité du tissu mammaire à fixer la relaxine marquée n'apparaît qu'au 17e jour de gestation, jour où l'on commence à pouvoir détecter la relaxine endogène dans le sérum de la ratte. Les auteurs ont pensé que la relaxine, tout comme la prolactine, induit la formation de ses propres récepteurs.

Par ailleurs, suivant le même protocole, il n'a pas été possible de prouver la présence de récepteurs spécifiques au niveau du foie, de la rate ou du coeur dans les mêmes espèces.

Poussant plus loin leurs recherches, Mc MURTY & Coll (93) montrent que c'est au niveau des fibroblastes, issus de cultures de cellules prélevées au niveau de la symphyse pubienne de la souris, que se localisent ces sites. Il apparaît alors que l'effet de la relaxine sur ces cellules serait de nature mitogène. Curieusement, le même effet mitogène de la relaxine a été remarqué sur des fibroblastes de peau humaine in vitro. Bien qu'aucune explication ne puisse encore être avancée, cette découverte ouvre des possibilités alléchantes quand à l'usage thérapeutique de la relaxine pour traiter certaines affections cutanées chez l'homme, déjà pressenties en 1958 par CASTEN & BOUCEK (19).

E. MECANISMES DE CONTROLE DE LA SECRETION

Les tout premiers travaux d'HISAW et ZARROW sur le cobaye (72) ont montré que chez les animaux ovariectomisés, les oestrogènes et la progestérone provoquent la formation de relaxine endogène par l'utérus (encore qu'à l'époque, les auteurs ne savaient pas comment les stéroïdes pouvaient induire la synthèse d'un polypeptide). Des travaux ultérieurs ont montré que le rôle initiateur des stéroïdes dans la sécrétion de relaxine pouvait être étendu à de nombreuses espèces.

SCHWABE & Coll (130) montrent que l'Aminoglutéthimide (qui bloque la conversion du cholestérol en prégnénolone) empêche l'assouplissement du col chez la ratte gestante, et même bloque l'accouchement, avec une réduction marquée du taux de relaxine sérique chez ces animaux. L'injection de stéroïdes au moment de l'accouchement n'ayant pas provoqué la sécrétion de relaxine endogène en réponse, ceci tendrait à prouver que les stéroïdes contrôlent la synthèse de la relaxine, et pas sa sécrétion.

A J 15 de gestation chez la ratte, les prostaglandines ne modifient pas la quantité de relaxine circulante alors qu'ils provoquent l'effondrement du niveau de progestérone circulante. L'HCG et la prolactine n'exercent elles non plus, aucun effet. Chez la truie par contre, les prostaglandines augmentent la concentration sanguine de relaxine de façon immédiate, et par la suite le taux sérique n'atteint plus la quantité normale prévue au moment de l'accouchement. Même effet par l'ocytocine : le contrôle dans ce cas porterait donc sur la sécrétion de la relaxine.

Chez la femme, ni l'ocytocine, ni les prostaglandines ne modifient les concentrations plasmatiques de relaxine (74) lors de l'accouchement mais l'HCG augmente le taux sérique de l'hormone à un certain stade du cycle.

Etant donné la disparité de ces constatations, il est difficile de proposer un mécanisme de contrôle de sécrétion de l'hormone. Plusieurs autres hormones interviennent mais les conditions et les modalités varient suivant les espèces.

De façon générale, chez les mammifères étudiés, les concentrations de relaxine dans le corps jaune, ou dans d'autres tissus n'atteignent le maximum que pendant la gestation. Peu ou pas de relaxine dans le corps jaune cyclique du rat, du porc ou de la femme, sauf si la vie du corps jaune est prolongée artificiellement par hystérectomie ou traitement hormonal. D'où l'hypothèse que, physiologiquement, un facteur produit par le placenta est nécessaire pour stimuler la synthèse de relaxine par le corps jaune chez la femelle gestante (130). Reste à savoir quel serait le facteur placentaire en cause ?

F. ROLE PHYSIOLOGIQUE DE LA RELAXINE

Nombreux sont les auteurs qui ont attribué à la relaxine un rôle de premier plan dans le maintien de la gestation et le déroulement harmonieux de la parturition, mais toutes les études envisagées ici n'ont pas permis de dégager un schéma clair et rigoureux de l'ensemble des phénomènes. A l'évidence, la relaxine n'a qu'un rôle de second plan par rapport aux stéroïdes sexuels.

Le maintien de la gestation, par exemple, peut être obtenu chez la souris ovariohystérectomisée par une association oestro-progestagènes seuls. La relaxine n'y a qu'un rôle améliorateur permettant de n'avoir recours qu'à des doses moins élevées de stéroïdes, d'où l'hypothèse que la relaxine aurait un rôle d'épargne vis à vis des autres hormones.

En ce qui concerne l'accomplissement de la parturition, le rôle est beaucoup plus certain : l'assouplissement du col et des ligaments pubiens sont indéniablement le fait de la relaxine. PORTER (109) propose pour la ratte, un mécanisme hormonal d'accouchement où l'utérus, tout en préservant la sécurité des foetus, serait préparé à une efficacité maximum au moment de leur expulsion : la progestérone inhibie la formation des récepteurs cytoplasmiques aux oestrogènes dans l'utérus pendant la gestation, et par là, empêche les oestrogènes d'augmenter la quantité de récepteurs à l'ocytocine. Avec la chute du taux sanguin de progestérone, se manifestent les effets des oestrogènes. Les récepteurs utérins à l'ocytocine deviennent plus nombreux, augmentant ainsi la sensibilité de l'organe et la concentration en prostaglandines augmente au niveau de l'utérus. Les oestrogènes augmentent la conductivité du muscle utérin, peut être par l'intermédiaire des prostaglandines, en augmentant le nombre des contacts de cellule à cellule.

Ces changements, qui normalement conduisent à une augmentation de l'activité spontanée, ont lieu sous l'influence protectrice de la relaxine, qui elle-même pourrait être synthétisée en réponse à l'augmentation du taux d'oestrogènes circulants. La relaxine inhibe toute activité spontanée, d'où la quiescence avant terme, mais laisse la possibilité pour l'utérus, de répondre pleinement à l'ocytocine. On ignore lors de l'accouchement s'il se produit une baisse de la concentration plasmatique de relaxine, qui d'ailleurs ne semble pas indispensable du fait de la puissance des effets conjugés de l'ocytocine et des prostaglandines. De nombreux effets de la relaxine : inhibition de l'activité du myomètre, séparation pubienne, imbibition hydrique des tissus, stockage du glycogène par l'utérus, ressemblent beaucoup à ceux que l'on peut provoquer avec les oestrogènes chez les animaux ovariéctomisés. La seule différence réside dans la rapidité d'action, beaucoup plus grande avec la relaxine qu'avec les oestrogènes. Il a été envisagé (PORTER - 105) que la relaxine pouvait

être le médiateur de certains effets des oestrogènes sur les tissus cibles ; la preuve en serait la coïncidence des pics sériques d'oestrogènes et de relaxine en fin de gestation chez le lapin et la truie..

Appartenant, structuralement, à la famille des polypeptides du type insuline (insuline, NGF, somatomedines, EGF et NILSA) dont on connaît l'action pléïotypique sur les tissus cibles, la relaxine peut très bien, de façon semblable avoir des effets variés sur plusieurs tissus.

CONCLUSION

La relaxine est une hormone peptidique dont l'action vis à vis de l'appareil génital femelle, se manifeste principalement lors de la gestation.

C'est son activité que l'on a découvert en premier lieu et il a fallu longtemps pour que soient mises au point les méthodes permettant de l'extraire sans impuretés et de la doser avec précision, et pendant cette période de latence, on a réellement douté du bien fondé des premières découvertes. Il apparaît maintenant indispensable que toutes les expériences réalisées avec des extraits impurs soient reconduites avec l'hormone purifiée, voire la molécule spécifique de façon à avoir une notion du degré de fiabilité des résultats publiés.

Ainsi, dans les dix prochaines années pourra-t-on pousser plus avant les recherches, avec davantage de précision de façon à savoir quelle est la place réelle de cette hormone dans la biologie de la reproduction.

Si les possibilités entrevues à l'heure actuelle se confirment, on disposera alors d'un produit dont l'application thérapeutique est promise à un brillant avenir, tant en médecine humaine que vétérinaire.

Vu : le Professeur de l'Ecole Vétérinaire rapporteur

P. ROYAL

Vu : le Président de la Thèse

P. MONROLIES

Vu : le Directeur de l'Ecole Vétérinaire

P. R. LAUTIE

Vu et Permis d'Imprimer
Toulouse, le 12.01.1982
L'administrateur Provisoire de l'Université Paul Sabatier

D. BANCEL

BIBLIOGRAPHIE

-1- ABRAMOWITZ(A.A), MONEY(W.L), ZARROW(M.X.), TALMAGE(R.V), KLEINHOLZ(L.H) HISAW F.L. - Preparation,biological assay and properties of relaxin. Endocrinology 1944,(34),103-114.

-2- ABRAMOWITZ(A.A.), ROBERTS(S.M),WILSON(P.D) - Relaxation of the pelvic joints in pregnancy. Surgery Gynec. Obstet. 1934, (63), 595.

-3- AFELE(S.),BRYANT-GREENWOOD (G.D.);CHAMLEY (W.A.);DAX (M.E.) - Plasma relaxin immunoactivity in the pig at parturition and during nuzzling and suckling. J.Reprod. Fert.1979, (56) ,451-457.

-4- ANDERSON (L.L.) ,BAST (J.D.) ,MELAMPY (R.M.) -Relaxin in ovarian tissue during different reproductive stages in the rat. J.Endocr. 1973, (59), 371-372.

-5-ANDERSON (M.L.) ,LONG (J.A.) -Localization of relaxin in the pregnant rat. Bioassay of tissue extracts and cell fractionation studies. Biol. Reprod. 1978,(18),110-117.

-6-BEDARKER(S.) ,TURNER (W.G.) ,BLUNDELL (T.L.) ,SCHWABE (C.) - Relaxin has conformational homology with insulin. Nature Lond.1977 (270) 449-451

-7-BELT (W.D.) ,ANDERSON (L.L.) ,CAVAZOS (L.F.) ,MELAMPY (R.M.) -Cytoplasmic granules and relaxin levels in porcine corpora lutea. Endocrinology, 1971 , (89) ,1-10.

-8-BIGAZZI (M.) ,NARDI (E.) ,BRUNI (P.) ,PETRUCCI (F.) - Relaxin in human decidua. J. Clin. Endoc. Metab. 1980, (51) , 939-941.

-9-BLOOM (G.) ,PAUL (K.G.) ,WIQVIST (N.) - A uterine relaxing factor in the pregnant rat. Acta Endoc. 1958, (28) , 112-118.

-10-BRENNAN (D.M.) ,ZARROW (M.X.) ,-Water and electolyte content of the uterus of the intact and adrenalectomized rat treated with relaxin and various steroids. Endocrinology, 1959, (65) , 907.

-11-BRET (A.J.) -Relaxin : its use and its results during pregnancy in threatened abortion and premature labor. Revue Fr. Gyneco. Obstét. 1963 , (58) , 649-668.

-12-BRYANT (G.D.) -The detection of relaxin in porcine, ovine, and human plasma by radioimmunoassay. Endocrinology, 1972, (91), 1113-1117.

-13-BRYANT (G.D.) , PANTER (M.E.A.) , STELMASIAK (T.) - Immunoreactive relaxin in human serum during the menstrual cycle. J. Clin. Endoc. Metabol. 1975 , (41) , 1065-1068.

-14-BRYANT (G.D.) ,CHAMLEY (W.A.) , -Plasma relaxin and prolactin immunoactivities in pregnancy and at parturition in the ewe.
J. Reprod. Fert. 1976a ,(48) , 201-204.

-15-BRYANT (G.D.) , CHAMLEY (W.A.) -Changes in relaxin and prolactin immunoactivities in ovine plasma following suckling.
J. Reprod. Fert. 1976b , (46) , 457-459.

-16-BRYANT (G.D.) , SASSIN (J.F.) , WEITZMAN (E.D.), KAPEN (S.) , FRANZ (A.) Relaxin immunoactivity in human plasma during a 24-hr period.
J. Reprod. Fert. 1976 ,(48), 389-392.

-17-BRYANT-GREENWOOD (G.D.) , GREENWOOD (F.C.)- The specifity of radioimmunoassay for relaxin. J. Endoc. 1979 (81), 239-247.

-18-DE CAMILIS (L.) , POZZIE (V.) ,- Radiological study of the pubic symphysis after administration of relaxin. Minerva Ginec. 1961, (13) , 19-21.

-19-CASTEN (C.G.) , BOUCEK (R.J.), - Use of relaxin in the treatment of scleroderma. J. Am. Med. Ass. 1958 , (166) , 319-324.

-20-CASTRO-HERNANDEZ (A.) , LARKIN (L.H.) , WARNICK (A.C.) , FIELDS (M.J.)
Isolation of bovine relaxin. J. Anim. Sci. 1976 , (36) , 277-278.

-21-CHAMLEY (W.A.) , BAGOYO (M.M.) , BRYANT-GREENWOOD (G.D.) - In vitro response of relaxin treated rat uterus to prostaglandins and oxytocin.
Prostaglandins. 1977 , (14) , 763-769.

-22-CHAMLEY (W.A.) , STELMASIAK (T.) ,BRYANT (G.D.) , -Plasma relaxin immuno-activity during the oestrous cycle of the ewe.
J. Reprod. Fert. 1975 , (45) , 455-461.

-23-COHEN (H.) , -Relaxin : studies dealing with isolation purification,and characterization. Trans. N.Y. Acad. Sci. 1963 ,(25) ,313-331.

-24-COURRIER (R.) - 1945 Endocrinologie de la gestation .
Masson ed. Paris.

-25-COWIE (A.T.) ,COX (C.P.) ,FOLLEY (S.J.) ,HOSKING (Z.D.) ,TINDAL (J.S.) - Relative efficiency of crystalline suspensions of hexoestrol and of oestradiol monobenzoate inducing mammary development and lactation in the goat; and effects of relaxin on mammogenesis and lactation.
J. Endocr. 1965 , (31) , 165-172.

-26-CRELIN (E.S.) , - The effects of androgen, oestrogen, and relaxin on intact and transplanted pelves in mice.
Am. J. Anat. 1954 , (95) , 47-73.

-27-CRELIN (E.S.) , - The reponse of the pubic symphysis in castrate mice to relaxin alone . Am. J. Anat. 1956 ; (98) , 273-291.

-28-CRELIN (E.S.) - Injections of oestradiol benzoate and relaxin into the pubic symphysis of mice.
Anat. Rec. 1958 , (130) , 400-401.

-29-CRELIN (E.S.) - The development of immature interpubic tissue into a symphysis when transplanted in female mice.
Anat. Rec. 1960 , (136) , p 179.

-30-CRELIN (E.S.) , HAINES (I.) - The effects of locally applied oestrogen on the pubic symphysis and knee joint in castrated mice.
Endocrinology , 1955 , (56) , 461-470.

-31-CULLEN (B.M.) , HARKNESS (R.D.) - The effects of hormones on the physical properties and collagen contents of the rat's uterine cervix.
J. Physiol. Lond. 1960 , (152) , 419-436.

-32-CULLEN (M.B.) , HARKNESS (R.D.) , -Effects of ovariectomy and of hormones on collagenous framework of the uterus.
Am. J. Physiol. 1964 , (206) , 621-627.

-33-DALLENBACH-HELLWEG (G.) ,BATTISTA (J.V.) , DALLENBACH (F.D.) , immunohistological and histochimical localisation of relaxin in the metrial gland of the pregnant rat.
Am. J. Anat. 1965 , (117) , 433-450.

-34-DANFORTH (D.N.) , VIES (A.) ,BREEN (M.) , WEINSTEIN (H.G.) ,BUCKINGHAM (J.C.) , MANALO (P.) - The effect of pregnancy and labor on the human cervix : changes in collagen, glycoproteins and glycosamino-glycans. Am. J. Obstet. Gynec. 1974 , (120) , 641-649.

-35-DEWAR (A.D.) , HALL (K.) , NEWTON (W.H.) - Potentiation of the vaginal response to oestrone by the "relaxin" fraction of pregnant rabbit serum. J. Physiol. Lond. 1946 , (105) , p.37.

-36-DUBOIS (M.P.) , DACHEUX (J.L.) , - Rrelaxin, a male hormone? Immuno-cytological localization of a related antigen in the boar testis.
Cell Tissue Res. 1978 , (187) , 201-214.

-37-EGGEE (C.J.) ,DRACY (A.E.) - Histological studies of effects of relaxin on the bovine cervix.
J. Dairy Sci. 1966 , (49) , 1053-1057.

-38-EICHNER (C.E.) , WALTNER (C.) , GOODMAN (M.), POST(S.) , -Relaxin, the third ovarian hormone : its experimental use in women.
Am. J. Obstet. Gynec. 1956 , (71) ,p.1035.

-39-FELTON (L.C.) ,FRIEDEN (D.H.) ,BRYANT (H.R.) - The effects of ovarian extracts upon activity of the guinea-pig uterus in situ.
J. Pharmac. Exp. Ther. 1953 , (107) , 160-164.

-40-FEVOLD (H.L.) ,HISWAW (F.L.) , LEONARD (S.L.) - The hormones of the corpus luteum. Separation and purification of three active substances.
J. Am. Chem. Soc. 1932 , (54) , p.254.

-41-FIELDS (M.J.) ,FIELDS (P.A.) , CASTRO-HERNANDEZ (A.) , LARKIN (L.H.) - Evidence for relaxin in corpora lutea of late pregnant cows.
Endocrinology 1980 , (107) , 869-875.

-42-FIELDS (P.A.) ,LARKIN (L.H.) - Enhancement of uterine cervix extensibility in oestrogen primed mice following administration of relaxin. J. Endoc. 1980 , (87) , 147-152.

-43-FIELDS (P.A.) , LARKIN (L.H.) , - Purification and histochemical localization of relaxin in human term placenta .
J. Endoc. Metab. 1981 , (52) ; 601-604.

-44-FINN (C .A.) , PORTER (D.G.) - Handbooks in reproductive biology Vol. 1 The Uterus 1975 (ed. C.A. Finn) Paul Elek, London.

-45-FITZPATRICK (R.J.) , -Changes in cervical function at parturition.
Ann. Rech. Vet. 1977 , (8) , 348-349.

-46-FOLSOME (C.E.) ,HARAMI (T.) , LAVIETES (S.R.) ,MASSEL (G.) - Clinical evaluation of relaxin.
Obstet. Gynec. N.Y. 1956 ,(8) ,p.356.

-47-DE FREMERY (P.) , KOBER (S.) , TAUSK (M.) - Erweiterung der Symphysis pubis des Weiblichen Meerschweinchens durch Menformon.
Acta Brev. Neerl. Physiol. 1931 , (1) , 146-148.

-48-FRIEDEN (E.H.) -Non-steroid ovarian hormones: observations on the mechanism of the acquisition of relaxin resistance in guinea-pigs.
Endocrinology 1958 , (62) , 41-46.

-49-FRIENDEN (E.H.) - Purification and electrophoretic properties of relaxin preparations.
Trans. N. Y. Acad. Sci. 1963 , (25) , 331-336.

-50-FRIENDEN (E.H.) , ADAMS (W.C.) ,- The response toendogenous relaxin of guinea-pigs refractory to porcine relaxin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1977 , (155) ; 558-561.

-51-FRIEDEN (E.H.) , HISAW (F.L.) ,- The mechanism of symphyseal relaxation. The distribution of reducing groups, hexosamine and proteine in normal and relaxed guinea-pig.
Endocrinology , 1951 , (48) , 88-97.

-52-FRIENDEN (E.H.) ,YEH (L.A.) - E vidence for a "pro-relaxin" in porcine relaxin concentrates.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1977 , (54) ,407-411.

-53-GARDNER (W.V.) - Sexual dimorphism of the pelvis of the mouse. Effects of oestrogenic hormones upon the pelvis.
Am. J. Anat. 1936 , (59) , 459-483.

-54-GARETT(F.A.) , TALMAGE (R.V.) -The influence of relaxin on mammary gland development in guinea-pigs and rabbits.
J. Endocrinol. 1952 , (8) , 336-340.

-55-GRAHAM (E.F.) , DRACY (A.E.) - The effect of relaxin and mechanical dilatation on the bovine cervix.
J. Dairy Sci. 1953 , (36) , 772-776.

-56-GRISS (G.) , KECK (J.) , ENGELHORN (R.) , TUPPY (H.) - The isolation and purification of an ovarian polypeptide with uterine relaxin activity. Biochim. Biophys. Acta. 1967 , (140) , 45-54.

-57-HALL (K.) - Further notes on the action of oestrone and relaxin on the pelvis of the spayed mouse, including a single dose test of potency of relaxin. J. Endocr. 1948 , (5) , p.314.

-58-HALL (K.) - The symphysis in mice in which pregnancy was maintained after ovariectomy by injecting progesterone alone or with oestradiol and relaxin. J. Physiol. Lond. 1956 , (134) , p.3.

-59-HALL (K.) - The effect of relaxin extracts , progesterone, and oestradiol on maintenance of pregnancy, parturition, and rearing of young after ovariectomy in mice.
J. Endocr. 1957 , (15) , 108-117.

-60-HALL (K.) - Relaxin. J. Reprod. Fert. 1960 , (1) , 368-384.

-61-HALL (K.) - Modification by relaxin of the response of the reproductive tract of mice to oestradiol and progesterone.
J. Endocr. 1960 , (20) , 355-364.

-62-HALL (K.) , NEWTON(W.H.) - The effects of oestrone and relaxin on the X-ray appearance of the pelvis of the mouse.
J. Physiol. Lond. 1947 , (106) , p.18

-63-HALL (K.), HOARE (M.) , TURNER (C.B.) - Relaxin in the blood of preparturient ewes. J. Endocr. 1962 , (25) , 271-278.

-64-HALMOSKY (M.) , SPARROW (R.C.) - Influence of relaxin on mammary development in sexually immature female rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1945 , (60) , 8 -9.

-65-HARNESS (H.R.) , ANDERSON (R.R.) - Effects of relaxin on mammary gland growth and lactation in the rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1975 , (148) , 933-936.

-66-HARNESS (J.R.) , ANDERSON (R.R.) - Effects of relaxin in combination with prolactin and ovarian steroids on mammary gland growth in hypophysectomized rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1977 , (156) , 354-358.

-67-HINDSON (J.C.) ,SCHOFIELD (B.M.) ,TURNER (C.B.) - The effect of a single dose of stilboestrol on cervical dilatation in sheep.
Res. Vet. Sci. 1967 , (8) ,353-360.

-68-HISAW (F.L.) - Experimental relaxation of the pubic ligament of the guinea-pig. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1926 , (23) , 661-663.

-69-HISAW(F.L.) - Experimental relaxation of the pubic symphysis of the guinea-pig. Anat. Rec. 1927 , (37) ,p.126.

-70-HISAW (F.L.) , HISAW (F.L.) - Effect of relaxin on the uterus of monkeys(Maccaca mulatta) with observations of the cervix and symphysis pubis. Am. J. Obstet. Gynec. 1964 , (89) , 141-155.

-71-HISAW (F.L.) , HISAW (F.L.) , DAWSON (A.B.) - Effects of relaxin on the endothelium of endometrial blood vessel in monkeys.
Endocrinology 1967 ; (81) , 375-385.

-72-HISAW (F.L.) , ZARROW (M.X.) - The physiology of relaxin.
Vitam. Horm. Lpz. 1950 , (8) , 151- 178.

-73-HISAW (F.L.) ,ZARROW (M.X.) , MONEY (W.L.) ,TALMAGE (R.V.) , ABRAMOWITZ (A.A.) - Importance of the female reproductive tract in the formation of relaxin. Endocrinology , 1944 , (34) , 122-134.

-74-HOCHMAN (J.) , WEISS (G.) , STEINETZ (B.G.) , O'BYRNE (E.M.) - serum relaxin concentrations in prostaglandin- and oxytocin-induced labor in women. Am. J. Obstet. Gynecol. 1978 ,(130) ,473-474.

-75-HORN(E.H.) _ Effects of feeding thiouracil and/or thyroid powder upon pubic symphyseal separation in female mice.
Endocrinology 1958 , (63) , 481-486.

-76-HUNTER (W.M.) , GREENWOOD (F.C.) - Preparation of iodine-131 Labelled human growth hormone of high specific activity.
Nature London, 1962 , (194) , 495-496.

-77-ISAACS (N.) , JAMES (R.) , NIAL (H.) , BRYANT-GREENWOOD (G.) , DODSON (G.), EVANS (A.) , NORTH (A.C.T.) - Relaxin in its structural relationships with insulin. Nature Lond. 1978 , (271) ; 278-281.

-78-JAGIELLO (G.) - Effects of selected hormones of the closed vaginal membrane of the ovariectomized guinea-pig.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1965 , (118) , 412-414.

-79-JAMES (R.) , NIALL (H.D.) , KWOK (S.) , BRIANT-GREENWOOD (G.D.) - primary structure of porcine relaxin, homology with insulin and related growth factor.
Nature London 1977 , (267) , 544-546.

-80-KENDALL (J.Z.) ,PLOPPER (C.G) , BRYANT-GREENWOOD (G.D.) - Ultrastructural immunoperoxydase demonstration of relaxin in corpora lutea of a pregnant sow. Biol. Reprod. 1978 , (18) , 94-98.

-81-KENNEDY (T.F.) , - Effect of relaxin on oestrogen-induced uterine luminal fluid accumulation in the ovariectomized rat.
J. Endocr. 1974 , (61) , 347-353.

-82-KLIMAN (B.) , SALHANICK (H.A.) , ZARROW (M.X.) - The response of the pubic symphysis of the mouse to extacts of pregnant rabbit serum and pregnant sow ovaries and its applications as an assay method.
Endocrinology 1953 , (53) , 391-402.

-83-KRANTZ (J.C.) , BRYANT (H.H.) , CARR (C.J.) - The action of aquous corpus luteum extract upon uterine activity.
Surgery Gynec. Obstet. 1950 , (90) , 372-375.

-84-KROC (R.L.) , STEINETZ (B.G.) , BEACH (V.L.) - The effects of oestrogens prosgestagens and relaxin in pregnant and non pregnant laboratory rodents. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1959 , (75) ,942-980.

-85-LARKIN (L.H.) , FIELDS (P.A.) , OLIVER (R.M.) - Production of antisera agains electrophoretically separated relaxin and immunofluorescent localization of relaxin in the porcine corpus luteum.
Endocrinology, 1977 , (101) , 679-685.

-86-LEITCH (I.) , HYTTEN (F.E.) , BILLEWICZ (W.Z.) - Maternal and neonatal weights of some mammalia.
Proc. Zool. Soc. Lond. 1959 , (113) , 11-28.

-87-LEPPI (T.J.) , KINNISON (P.A.) - The connective tissue ground substance in the mouse uterine cervix: an electron microscopic histochemical study. Anat. Rec. 1971 , (170) , 97-118.

-88-LONG (J.A.) - Corpus luteum of pregnancy in the rat: ultrastructural and cytochemical observations.
Biol. Reprod. 1973 , (8) , 87-99.

-89-LOUMAYE (E.) , DE COOMAN (S.) , THOMAS (K.) - Immunoreactive relaxin-like substance in human seminal plasma.
J. Clin. Endoc. Metab. 1980 , (50) , 1142-1143.

-90-Mc CARTHY (J.J.) ,ERVING (H.W.) , LAUFE (L.E.) - Preliminary report on the use of relaxin in the maintenance of threatened premature labor.
Am. J. Obstet. Gynecol. 1957 , (74) , 134-138.

-91-Mc LENNAN (A.M.) , GREEN (R.C.) , BRYANT-GREENWOOD (G.D.) , GREENWOOD (F.C.) SEAMARK (R.F.) - Ripening of human cervix and induction of labour with purified porcine relaxin.
Lancet, 1980 , (Feb.) , 220-223.

-92-Mc MURTY (J.P.) , KWOCK (S.C.M.) , BRYANT-GREENWOOD (G.D.) - Target tissues for relaxin identified in vitro with I-125 porcine relaxin.
J. Reprod. Fert. 1978 , (53) ,209-216.

-93-Mc MURTY (J.P.) , FLOERSHEIM (C.L.) ,BRYANT-GREENWOOD (G.D.) - Characterization of the binding of an I-125 labelled succinylated porcine relaxin to human and mouse fibroblasts.
J. Reprod. Fert. 1980 , (58) , 43-49.

-94-MANNING (J.P.) , STEINETZ (B.G.) , BUTLER (M.C.) , PRIESTER (S.) - The effects of steroids and relaxin on acid phosphatase in the pubic symphysis of the ovariectomized mouse.
J. Endocr. 1965 , (33) , 501-506.

-95-MATSUMOTO (D.) ; CHAMLEY (W.A.) - Identification of relaxins in porcine follicular fluid and the ovary of the immature sow.
J. Reprod. Fert. 1980 , (58) , 369-375.

-96-MILLER (J.W.) , KISLEY (A.) , MURRAY (W.J.) - The effects of relaxin-containing ovarian extracts on various types of smooth muscle.
J. Pharmac. Exp. Ther. 1957 , (120) , 426-437.

-97-NAGAI (S.) - Regulation of relaxin scretion.
Tohoku J. Exp. Med. 1966 , (90) , 219-232.

-98-O'BYRNE (E.M.) , STEINETZ (B.G.) -Radioimmunoassay (RIA) of relaxin in sera of various species using an antiserum to porcine relaxin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1976 , (152) , 272-276.

-99-O'BYRNE (E.M.) , SAWYER (W.K) , BUTLER (M.C.) , STEINETZ (B.G.) - Serum immunoreactive relaxin and softening of the uterine cervix in pregnant hamster. Endocrinology , 1976, (99) , 1333-1335.

-100-O'BYRNE (E.M.) , FLITCRAFT (J.F.) ; SAWYER (W.I.) , HOCHMAN (J.) , WEISS (G.) , STEINETZ (B.G.) - Relaxin bioactivity and immunoactivity in human corpora lutea. Endocrinology , 1978 ,(102), p.1641.

-101-O'BYRNE (E.M.) , CARRIERE (B.T.) , SOERENSEN (L.) , SEGALOFF (A.) , SCHWABE (C.) , STEINETZ (B.G.) - Plasma immunoreactive relaxin lvels in pregnant and non pregnant woman.
J. Clin. Endoc. Metab. 1978 , (47) ,1106-1110.

-102-PATERSON (G.) - The nature of the inhibition of rat uterus by relaxin. J. Pharmac. 1965 , (17) , 262-264.

-103-PERKOFF (G.T.) , SALHANICK (H.A.) , ZARROW (M.X.) ,NELSON (D.H.) ; TYLER (F.H.) - Effects of administration of relaxin to human subjects. J. Clin. Endoc. Metab. 1954 , (14) , 531-539.

-104-PLUNKETT (E.R.) , GAMMAL (E.B.)- The effect of relaxin on DMBA-induced mammary cancer in female rats.
Br. J. Cancer , 1967 , (21) , 592-600.

-105-PORTER (D.G.) - The local effect of intra uterine progesterone treatment on myometrial activity in rabbit.
J. Reprod. Fert. 1968 , (15) , 437-445.

-106-PORTER (D.G.) - The action of relaxin on myometrial activity in the guinea-pig in vivo. J. Reprod. Fert. 1971 , (26) , 251-253.

-107-PORTER (D.G.) - Myometrium of the pregnant guinea-pig: the probable importance of relaxin. Biol. Reprod. 1972 , (7) , 458-464.

-108-PORTER (D.G.) - Inhibition of myometrial activity in the pregnant rabbit. Evidence for a new factor.
Biol. Reprod. 1974 , (10) , 54-61.

-109-PORTER (D.G.) - Myometrium and the relaxin enigma.
Animal Rep. Sci. 1979 , (2) , 77-96.

-110-PORTER (D.G.) , CHALLIS (J.R.G.) - Failure of high uterine concentrations of progesterone to inhibit myometrial activity in vivo in the post-partum rat.
J. Reprod. Fert. 1974 , (39) , 157- 162.

-111-PORTER (D.G.) , DOWNING (S.) - Relaxin inhibits spontaneous and PGF2α driven myometryal activity in anesthetized rats.
J. Endoc. 1978 , (83) ; 183-192.

-112-PORTER (D.G.) , DOWNING (S.) - Evidence that a humoral factor possessing relaxin-like activity is responsible for uterine quiescence in the late pregnant rat.
J. Reprod. Fert. 1978 , (52) , 95-102.

-113-PORTER (D.G.) -Relaxin: old hormone, new prospect.
In:Oxford Review of Reproduction and Endocrinology pp. 1 à 57.
Clarendon Press Oxford.

-114-POSSE (N.) , KELLY (J.V.) - A study of the effect of relaxin on contractility of the non pregnant uterus by internal tocometry
Surgery Gynec. Obstet. 1956 , (103) , 687-694.

-115-QUAGLIARELLO (J.) , SZLACHTER (N.) , STEINETZ (B.G.) ,GOLDSMITH (L.T.) , WEISS (G.) - Serial relaxin concentrations in human pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynec. 1979 , (135) , 43-44.

-116-QUAGLIARELLO (J.) , GOLDSMITH (L.T.) , STEINETZ (B.G.) , LUSTIG (D.G.) , WEISS (G.) - Induction of relaxin secretion in non-pregnant woman by H.C.G. J. Clin. Endoc. Metab. 1980 , (51) , 74-77.

-117-ROTH (L.H.) , AOYAMA (H.) - Induced abortion and its sequelae : prematury and spontaneous abortion.
Am. J. Obstet. Gyneco. 1974 , (120) , 868-874.

-118-RUDZIK (A.D.) , MILLER (J.W.) - The mechanism of uterine inhibitory action of relaxin-containing ovarian extracts.
J. Pharmac. Exp. Ther. 1962a ,(138) , 82-87.

-119-RUDZIK (A.D.) , MILLER (J.W.) - The effect of altering the catecholamine content of the uterus on the rate of the contractions and the sensivity of the myometrium to the relaxin.
J. Pharmac. Exp. Ther. 1962b , (138) , 88-95.

-120-RUTH (E.B.) - Metamorphosis of the pubic symphysis II : the guinea-pig. Anat. Rec. 1936 , (67) , 69-79.

-121-RUTH (E.B.) - Metamorphosis of the pubic symphysis III : histological changes in the symphysis of the pregnant guinea-pig.
Anat. Rec. 1937 , (67) , 409-412.

-122-SALAMIN (S.) , LIGHTFOOT (R.J.) - Fertlity of ram spermatozoa frozen by the pellet method. 3 The effect of insemination technique , oxytocin and relaxin on lambing.
J. Reprod. Fert. 1970 , (22) , 409-423.

-123-SAWYER (W.H.) , FRIEDEN (L.H.), MARTIN (A.C.) -In vitro inhibition of spontaneous contractions of the rat uterus by relaxin- containing extracts of sow ovaries.
Am. J. Physiol. 1953 , (172) , 547-552.

-124-SALIMIKHALIGH (H.) - Inhibition by relaxin of spontaneous contraction of the uterus of the Hamster in vitro.
J. Endocr. 1968 , (40) , 125-126.

-125-SCHMITH (J.E.) , LEONARD (S.L.) - The effect of relaxin on uterine phosphorylase in the rat. Endocrinology, 1960 , (67) , 663-667.

-126-SCHOFIELD (B.M.) The hormonal cpntrol of myometrial function during pregnancy. J. Physiol. Lond. 1957 , (138) , 1-10.

-127-SCHWABE (C.) , BRADDON (S.A.) - Evidence for one essential tryptophan residue at the active site of relaxin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976, (68), 1126-1132.

-128-SCHWABE (C.) , Mc DONALD (J.K.) , STEINETZ (B.G.) - Primary structure of the A chain of porcine relaxin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976, (70), 397-405.

-129-SCHWABE (C.) , Mc DONALD (J.K.) , STEINETZ (B.G.) -Primary structure of the B chain of porcine relaxin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1977, (75), 503-510.

-130-SCHWABE (C) , STEINETZ (B.G.) , WEISS (G.) ,SEGALOFF (A.) , Mc DONALD (J.K.) , O'BYRNE (E.) , HOCHMAN (J.) , CARRIER (B.) , GOLDSMITH (L.)
Relaxin. Recent Prog. Horm. Res. 1978 , (34) , 123-211.

-131-SHERWOOD (O.D.) - Purification and characterisation of rat relaxin
Endocrinology, 1979 , (104), 886-891.

-132-SHERWOOD (O.D.) , O'BYRNE (E.M.) -Purification and characterization of porcine relaxin.
Archs. Biochem. Biophys. 1974 , (160) , p.185.

-133-SHERWOOD (O.D.) , ROSENTRETER (K.R.) , BIRKHIMER (M.L.) -Development of a radioimmunoassay for porcine relaxin using 1-125 labelled polytyrosyl-relaxin.
Endocrinology, 1975 , (96) , 1006-1013.

-134-SHERWOOD (O.D.) , CHANG (C.C.) , BEVIER (G.W.) , DZIUK (P.J.) .
Radioimmunoassay of plasma relaxin levels throughout pregnancy and at parturition in the pig.
Endocrinology, 1975 , (98) , 384-387).

-135-SHERWOOD (O.D.) , WILSON (M.E.) , EDGERTON (L.A.) , CHANG (C.C.) Serum relaxin concentrations in pigs with parturition delayed by progesterone administration.
Endocrinology, 1978, (102) , 471-475.

-136-SHERWOOD (O.D.) , CHANG (C.C.) , BEVIER (G.W.) , DIEHL (J.R.) , DZIUK (P.J/) .
Relaxin concentrations in big plasma following the administration of prostaglandin F2 during late pregnancy.
Endocrinology, 1976 , (98), 875-879.

-137-SHERWOOD (O.D.) , CRNEKOVIC (V.E.) - Development of an homologous radioimmuoassay for rat relaxin.
Endocrinology, 1979 , (104) , 886-891.

-138-SHERWOOD (O.D.) , CRNELOVIC (V.E.) ,GORDON (W.L.) ,RUTHERFORD (J.E.)- Radioimmunoassay for relaxin througout pregnancy and during parturition in the rat. Endocrinology , 1980 , (107) , 691-697.

-139-SLATE (W.G.) - Effect of relaxin on the cervix of non-pregnant women. Obstet. Gynec. N. Y. 1961 , (17) , 294-296.

-140-STEINETZ (B.G.) , BEACH (V.L.) -Hormonal requirements for interpubic ligament formation in hypophysectomized mice.
Endocrinology , 1963 , (72) , 771-776.

-141-STEINETZ (B.G.) , BEACH (V.L.) , KROC (R.L.) - The physiology of relaxin in laboratory animals. 1959. In : Recent progress in the endocrinolgy of reproduction. (ed. C. Lloyd) pp.389-427.
Academic Press New York.

-142-STEINETZ (B.G.) , BEACH (V.L.) , BLYE (R.P.) , KROC (R.L.) - Changes in the composition of the rat uterus following a single injection of relaxin. Endocrinology , 1957 , (61), 287-292.

-143-STEINETZ (B.G.) , MANNING (J.P.) , BUTLER (M.C.) , BEACH (V.L.)- Relationships of growth hormone , steroids and relaxin in the transformation of pubic joint cartilage to ligament in hypophysectomized mice. Endocrinology , 1965 (76) , 876-882.

-144-STEINETZ (B.G.) , MANNING (J.P.) - Influence of growth hormone , relaxinand steroids on acid phosphatase activity of connective tissue. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1967 , (124), 180-184.

-145-STEINETZ (B.G.) , BEACH (V.) , KROC (R.L.) , STASILLI (N.R.) ,NUSSBAUM (R.E.) , NEMITH (P.H.) , DUNN (R.K.) - Bioassay of relaxin using a reference standard : a simple and reliable method utilizing direct measurement of pubic ligament formation in mice.
Endocrinology , 1960 , (67) , 102-115.

-146-STONE (M.L.) ,SEDLIS (A.) , ZUCKERMAN (M.B.) - Relaxin : a critical evaluation. Am. J. Obstet. Gynec. 1958 , (76) , 544-552.

-147-TALMAGE (R.V.) - A histological study of the effects of relaxin on the symphysis pubis of the guinea-pig.
J. Exp. Zool. 1947 , (106) , 287-297.

-148-TALMAGE (R.V.) , GARETT (F.A.) - Effects of repeated injections of steroids and relaxin on the symphysis pubis of the guinea-pig as studied by X-rays.
Endocrinology , 1951 , (58) , 162-168.

-149-TALMAGE (R.V.) ,HURST (W.R.) - Variability in the response of the symphysis pubis of the guinea-pig to relaxin.
J. Endocrinol. 1950 , (7) , 24-30.

-150-WAHL (L.M.) , BLANDAU (R.J.) , PAGE (R.C.) - Effect of hormones on collagen metabolism and collagenase activity in the pubic symphysis ligament. Endocrinology, 1977 , (100), 571-579.

-151-WALCZAK (J.R.) - Behaviour of the cervix during obstetric labor under the influence of relaxin.
Am. J. Osteop. Ass. 1960 , (59) , 49-52.

-152-WALSH (J.R.) , NIALL (H.D.) - Use of an octadecylsylica purification method minimizes proteolysis during isolation of porcine and rat relaxin. Endocrinology , 1980 ,(107) , 1258-1260.

-153-WIQVIST (N.) The effect of prolongated administration of relaxin on some functional properties of the non-pregnant mousse and rat uterus. Acta Endocr. Copenh. 1959,(32), Suppl.46 , 15-32.

-154-WIQVIST (N.) , PAUL (K.G.) - Inhibition of the spontaneous uterine motility in vitro as bioassay of relaxin.
Acta Endocr. Copenh. 1958 , (29) , 135-146.

-155-YAMAMOTO (S.) ,KWOK (S.C.M.) , GREENWOOD (F.C.) , BRYANT-GREENWOOD (G.D.) Relaxin purification from human placental basal plates.
J. Clin. Endoc. Metab. 1981 , (52) , 601-604.

-156-ZARROW (M.X.) - The role of the steroid hormones in the relaxation of the symphysis pubis of the guinea-pig.
Endocrinology , 1948 (42) , 129-140.

-157-ZARROW (M.X.) , BRENNAN (D.M.) - The action of relaxin on the uterus of the rat mouse and rabbit.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1959 , (75) , 981-990.

-158-ZARROW (M.X.) , O'CONNOR (W.B.) - Localization of relaxin in the corpus luteum of the rabbit.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966 (121) , 612-614.

-159-ZARROW (M.X.) , YOCHIM (J.) - Dilatation of the uterine cervix of the rat and accompanying changes during the oestrous cycle pregnancy and following treatment with oestradiol, progesterone and relaxin. Endocrinology, 1961 , (69) , 292-304.

-160-ZARROW (M.X.) ,HOLMSTROM (E.G.) , SALHANICK (H.A.) -The concentration of relaxin in the blood serum and other tissues of women during pregnancy.
J. Clin. Endocr. 1955 , (15) , 22-27.

-161-ZARROW (M.X.) , NEHER (G.M.) , SIKES (D.) ,BRENNAN (D.M.) , BULLARD (J.F.) Dilatation of the uterine cervix of the sow following treatment with relaxin.
Am. J. Obstet. Gynec. 1956 , (72) , 260-264.